



**Université de Montréal**

**Régulation de la kinase Ste20 Slik de *Drosophila* par  
phosphorylation de la boucle d'activation**

**par  
Vincent Panneton**

**Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine**

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de  
l'obtention du grade de Maîtrise en Biologie Moléculaire  
option générale

Décembre 2014

© Vincent Panneton, 2014

# Résumé

Les kinases constituent une famille majeure de protéines qui régulent divers processus par la phosphorylation de leurs substrats, mais aussi par leur activité non-catalytique. Ce rôle indépendant de l'activité kinase a été observé chez quelques protéines dont des membres de la famille Sterile-20. La kinase Ste20 Slik de *Drosophila* aide au maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux en phosphorylant l'ERM Moesin et peut aussi induire une prolifération cellulaire non-autonome indépendamment de son activité catalytique. La méthode de régulation de ces deux rôles était jusqu'ici inconnue. Nous avons identifié 19 sites de phosphorylation chez Slik par spectrométrie de masse. À l'aide de mutants, nous démontrons que les deux fonctions de Slik sont régulées par la phosphorylation d'au moins 2 résidus conservés de son segment d'activation par un mécanisme d'auto- et/ou *trans*-phosphorylation. Cette étude amène une meilleure compréhension de la régulation de l'intégrité épithéliale et de la croissance, deux processus clés qui sont souvent déréglés dans le cancer et certaines maladies génétiques.

**Mots-clés** : Slik, Moesin, kinase, épithélium, phosphorylation, prolifération, drosophile.

# Abstract

Kinases constitute a major protein family which regulate diverse pathways through the phosphorylation of their substrates, but also through their non-catalytic activity. This kinase-independent role has been observed in a few proteins such as certain members of the Sterile-20 family. The *Drosophila* Ste20 kinase Slik helps to maintain epithelial integrity by phosphorylating the ERM Moesin and it can also drive non-autonomous cellular proliferation in a kinase-independent fashion. The mechanism of regulation of these two roles was unknown up until now. We have identified 19 phosphorylation sites in Slik by mass spectrometry. Using Slik mutants, we show that its two functions are regulated by the phosphorylation of at least 2 conserved residues of its activation segment by an auto- and/or *trans*-phosphorylation mechanism. This research brings a better understanding of the regulation of epithelial maintenance and growth, two key processes which are deregulated in cancer and certain genetic diseases.

**Key words** : Slik, Moesin, kinase, epithelium, phosphorylation, proliferation, drosophila.



# Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Abréviations	viii
Remerciements	ix
1. INTRODUCTION	10
1.1 La drosophile en tant qu'organisme modèle	10
1.1.1 Les trois stades du développement de la drosophile	10
1.1.2 L'utilisation des disques imaginaux en recherche	12
1.1.3 Les outils génétiques utilisés chez la drosophile	12
1.1.4 Conservation de gènes entre la drosophile et les mammifères	17
1.2 Protéines kinases	17
1.2.1 Les kinases Sterile-20	18
1.3 Les deux rôles de la kinase Slik <i>in vivo</i>	20
1.3.1 Slik est impliquée dans la régulation de la croissance	20
1.3.2 Slik phosphoryle Moesin pour promouvoir l'intégrité épithéliale	23
1.4 Régulation des kinases Sterile-20	28
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	31
3. RÉSULTATS	32
3.1 Les sites de phosphorylation de Slik	32
3.1.1 L'ARNdb Slik 5'UTR permet de dépléter la forme endogène de Slik sans affecter les mutants	32
3.1.2 Slik est auto- et <i>trans</i> -phosphorylée	34
3.1.3 Carte des sites de phosphorylation de Slik	36
3.2 Résidus impliqués dans l'activation de Slik	38
3.2.1 T <sup>186</sup> , T <sup>192</sup> et T <sup>196</sup> sont importants pour l'activité kinase de Slik	38
3.2.2 Les mutants de Slik agissent directement sur Moesin	40
3.2.3 T <sup>186</sup> , T <sup>192</sup> et T <sup>196</sup> modulent l'activité kinase de Slik <i>in vivo</i>	42

3.3 Mécanisme de régulation de la prolifération induite par Slik	44
3.3.1 La croissance induite par Slik ne dépend pas de l'activateur	44
3.3.2 La phosphorylation du segment d'activation régule l'activité non-catalytique de Slik	46
3.4 La mutation Slik Q188P n'affecte pas la dimérisation de Slik	48
4. DISCUSSION	50
4.1 Slik possède des motifs de phosphorylation conservés	50
4.2 L'auto- et la <i>trans</i> -phosphorylation servent à réguler Slik	51
4.3 T <sup>186</sup> , T <sup>192</sup> et T <sup>196</sup> régulent l'activité catalytique de Slik	52
4.4 L'activité non-catalytique de Slik peut être contrôlée par la phosphorylation du segment d'activation	54
4.5 Le mutant Slik Q188P ne présente aucun défaut fonctionnel	55
4.6 Limites des approches expérimentales	56
5. MATÉRIEL ET MÉTHODES	58
5.1 Matériel génétique	58
5.2 Culture cellulaire et transfection	58
5.3 Anticorps, immunoprécipitation et SDS-PAGE	59
5.4 Essais kinase <i>in vitro</i>	60
5.5 Métissage et génotypes des drosophiles	60
5.6 Immunocoloration, étiquetage par EdU	61
5.7 Spectrométrie de masse	62
6. BIBLIOGRAPHIE	63

# Liste des figures

Figure 1 - Le cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Figure 2 - Le disque imaginal de l'aile de <i>Drosophila</i>	13
Figure 3 - Le système GAL4-UAS	16
Figure 4 - Arbre des kinases Ste20	19
Figure 5 - Slik induit la croissance non-autonome sans activité kinase	21
Figure 6 - Slik phosphoryle Moesin	24
Figure 7 - Slik est un promoteur de l'intégrité épithéliale	26
Figure 8 - Slik est une phosphoprotéine <i>in vivo</i>	29
Figure 9 - «Knockdown» de Slik	33
Figure 10 - Auto- et <i>trans</i> -phosphorylation de Slik <i>in vitro</i>	35
Figure 11 - Identification des sites de phosphorylation de Slik par LC-MS/MS	37
Figure 12 - T <sup>186</sup> , T <sup>192</sup> et T <sup>196</sup> sont importants pour l'activation de Slik	39
Figure 13 - La phosphorylation de Moesin par Slik est directe	41
Figure 14 - T <sup>186</sup> , T <sup>192</sup> et T <sup>196</sup> sont impliqués dans la régulation de Slik <i>in vivo</i>	43
Figure 15 - La croissance induite par Slik ne dépend pas de l'activateur utilisé	45
Figure 16 - La phosphorylation du segment d'activation contrôle l'activité non-catalytique de Slik	47
Figure 17 - Le mutant Slik <sup>DIM</sup> n'affecte pas l'activité et la dimérisation de Slik	49

# Abréviations

AEL : After egg laying

*Ap* : Apterous

ARNdb : ARN double brin

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

Dcr : Dicer

DP : Disc proper

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ERM : Ezrin / Radixin / Moesin

GCK : Germinal center kinase

GFP : Green fluorescent protein

KD : Kinase dead

LC-MS/MS : Liquid chromatography - mass spectrometry (tandem)

LOK : Lymphocyte oriented kinase

Moe : Moesin

*Nub* : Nubbin

PAK : p21-activated kinase

PM : Peripodial membrane

*Ptc* : Patched

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SLK : Ste20 like kinase

Ste20 : Sterile-20

UAS : Upstream activation sequence

UTR : Untranslated region

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon superviseur de maîtrise, Dr. David. R. Hipfner. Ses conseils et son approche enthousiaste de la science m'ont fait progresser beaucoup plus rapidement que j'aurais cru possible. J'ai eu la chance d'évoluer dans un laboratoire où règne une atmosphère décontractée propice à l'entraide. Parmi mes collègues, je dédie un remerciement spécial à Dominic Maier qui a été mon premier mentor dans un laboratoire de recherche. Il a grandement contribué au projet rapporté dans ce mémoire. J'aimerais aussi remercier Dr. Denis Faubert du plateau de protéomique de l'IRCM pour avoir partagé son expertise en spectrométrie de masse. Finalement, je tiens à remercier mes amis et ma famille. Je ne sais pas comment j'aurais pu terminer ma maîtrise sans eux.

À Lynn qui a été ma complice de tous les jours et qui me fait voir la vie en rose, et à mes parents qui ont toujours cru en moi. Je vous aime.

# 1. INTRODUCTION

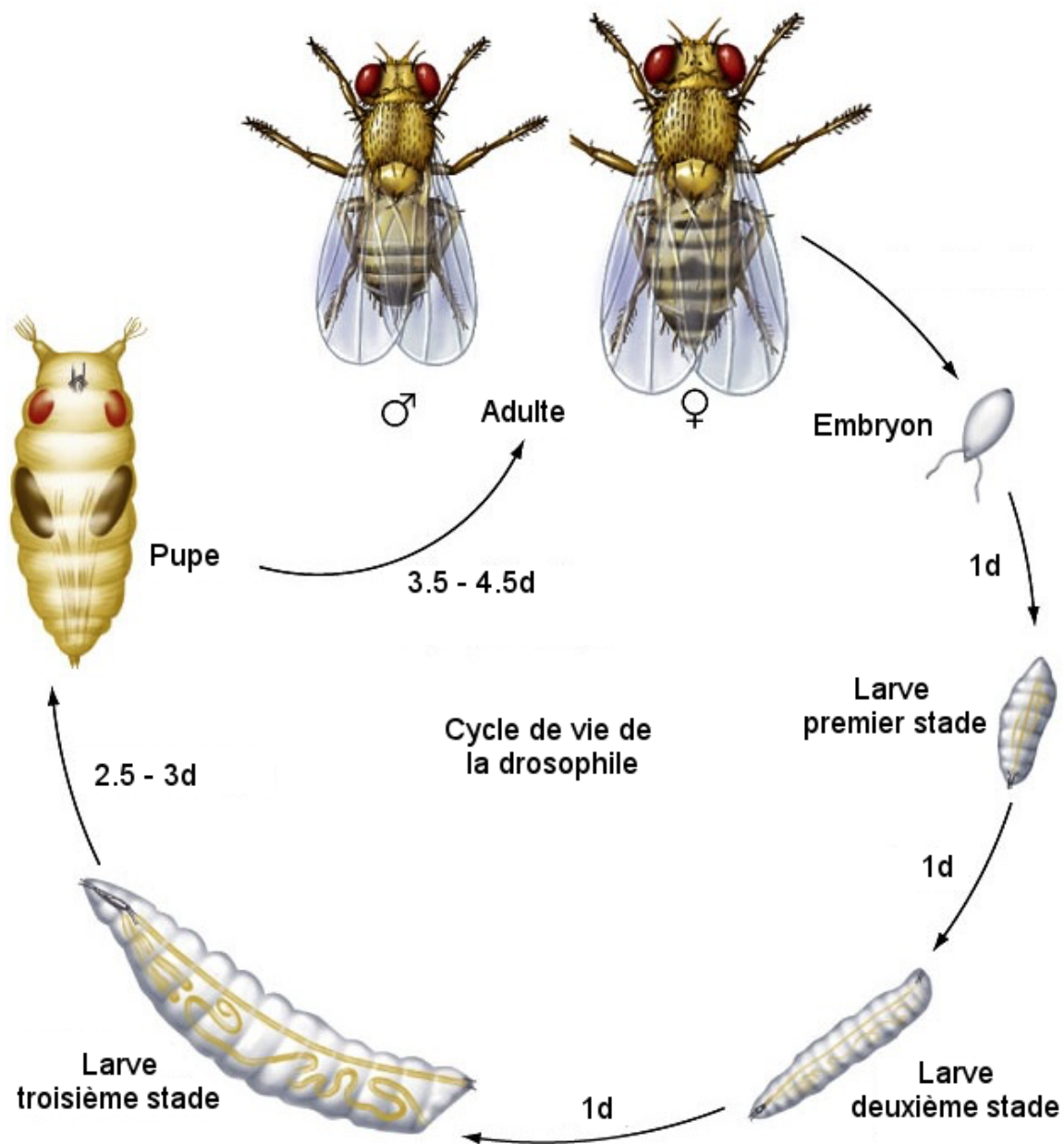
La régulation de la croissance et du maintien des tissus épithéliaux est un procédé complexe qui englobe de multiples effecteurs. Un équilibre doit être atteint entre la prolifération et la mort cellulaire pour assurer le bon développement de l'organisme. Ceci passe par un contrôle strict des différentes protéines impliquées sans quoi de multiples maladies peuvent survenir. De grandes avancées ont été faites, mais certains mécanismes restent à ce jour incompris. Ce mémoire décrit l'étude que nous avons faite sur le processus de contrôle d'une de ces protéines qui affecte le maintien des tissus épithéliaux et la prolifération cellulaire chez *Drosophila* : la kinase Slik.

## **1.1 La drosophile en tant qu'organisme modèle**

L'utilisation de *Drosophila* à des fins de recherche scientifique remonte aux travaux de T.H. Morgan qui a illustré le potentiel de cet organisme dans des domaines tels que la génétique (Morgan 1910). Ceci marque le début de l'arrivée d'une série d'outils qui ont permis la réalisation d'expériences jusqu'alors impossibles. Aussi, avec son court cycle de vie et la taille relativement petite de son génome, la drosophile s'est révélée être un excellent organisme modèle pour l'étude de la biologie du développement.

### **1.1.1 Les trois stades du développement de la drosophile**

Pour qu'une drosophile atteigne sa forme adulte, elle doit traverser trois stades soit : embryonnaire, larvaire et pupal (Fig. 1). La durée du cycle de vie de cet organisme est variable selon la température. Si celle-ci est maintenue à 25°C, il s'écoulera 10 jours entre la ponte et le stade adulte (Ashburner 2005). Sous les conditions optimales, l'embryon devient une larve en 1 jour et consomme plus ou moins 4 fois son propre poids pour arriver environ 4 jours plus tard à la migration du troisième stade larvaire. La larve sort alors de sa source de nourriture pour trouver un emplacement idéal à sa transformation en pupe. Suit alors une métamorphose durant environ 4 jours après quoi la mouche adulte émerge (Ashburner 2005).



**Figure 1 - Le cycle de vie de *Drosophila Melanogaster*.**

Suite à la ponte, l'embryon progresse vers le 1<sup>er</sup> stade larvaire en 1 jour, suivi du 2<sup>ème</sup> et du 3<sup>ème</sup> en 1 jour chaque. La larve migre et arrive au stade de la pupa en environ 2-3 jours et restera dans cette forme jusqu'à l'éclosion de la mouche adulte environ 4 jours plus tard pour un total de 10 jours. Figure modifiée de l'originale par Mike Adams, Eastern Connecticut State University. Consulté en novembre 2014.

<http://www.easternct.edu/~adams/images/drosophilalifecycle.jpg>

### **1.1.2 L'utilisation des disques imaginaux en recherche**

Le développement des structures caractéristiques de la mouche adulte telles que les ailes et les pattes se fait dans la larve et la pupe. Des sacs d'épithélium nommés disques imaginaux sont les précurseurs de ces structures. En environ 4 jours, la taille de ces disques peut augmenter par un facteur de 1000 pour passer de 50 cellules à 50 000 (Johnston and Gallant 2002). Lorsque la prolifération touche à sa fin, les disques sont alors composés de deux couches de cellules épithéliales formant une lumière centrale bordée des domaines apicaux des cellules (Fig. 2). La couche «Disc Proper» (DP) est faite de cellules épithéliales pseudostratifiées et composera la majeure partie d'une des structures de la mouche adulte. La couche «Peripodial Membrane» (PM) est composée de grandes cellules squameuses espacées. Durant le développement de la mouche, le stade prolifératif est séparé de la différenciation dans ces disques ce qui rend l'étude de mécanismes affectant la croissance aisée (Neto-Silva, Wells et al. 2009). Aussi, la simplicité de la structure de ces disques facilite leur manipulation et leur visualisation en microscopie. De plus, des outils génétiques ont été créés afin de pouvoir exprimer spécifiquement des protéines dans une section des disques imaginaux. Tous ces facteurs font en sorte que ces structures forment un système efficace pour étudier le développement et le maintien des tissus épithéliaux.

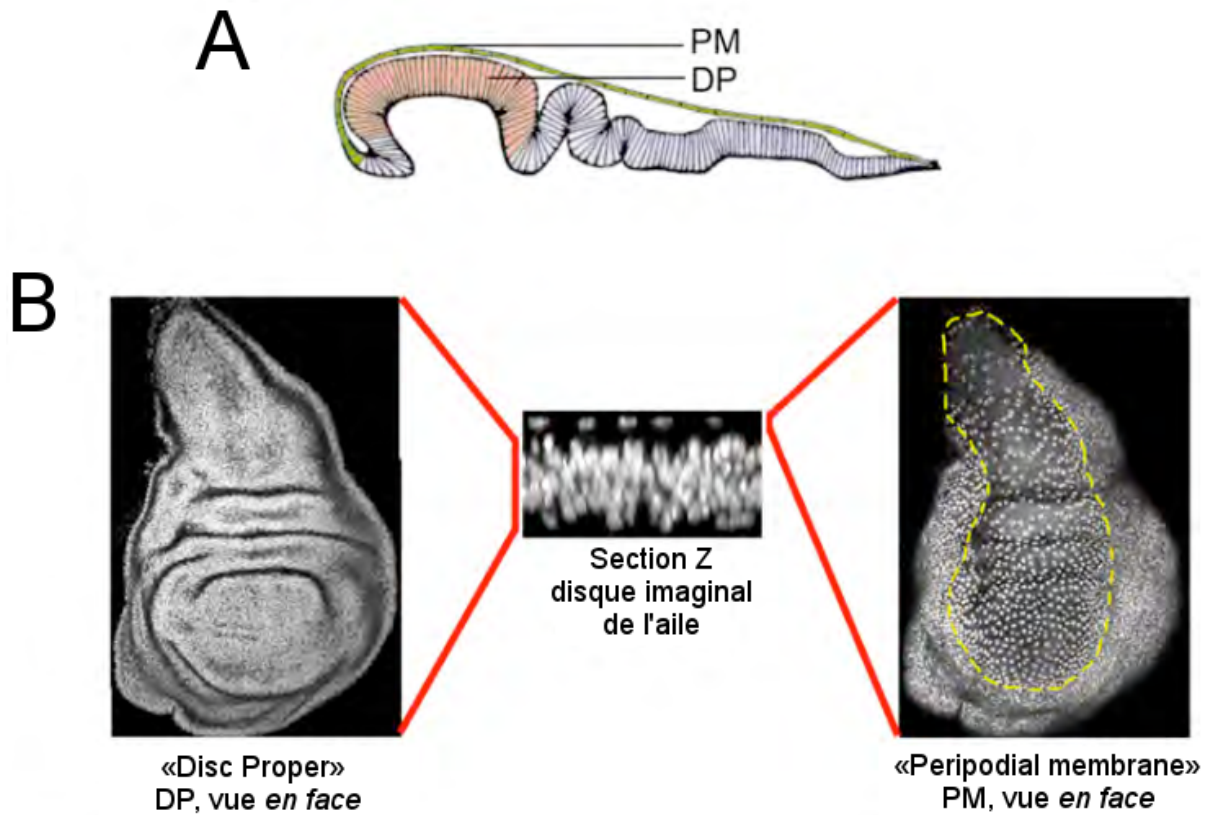
### **1.1.3 Les outils génétiques utilisés chez la drosophile**

L'une des raisons majeures de l'utilisation de la drosophile en recherche outre la facilité d'entreposage est la disponibilité de multiples outils développés spécifiquement dans ce modèle. Ceux-ci permettent de manipuler le matériel génétique de façon jusqu'alors inégalée. Les principales méthodes utilisées lors de la réalisation de ce projet sont décrites ci-dessous.

#### **1.1.3.1 Les chromosomes balanceurs**

Puisque la drosophile possède seulement quatre paires de chromosomes, leur manipulation s'avère plus simple que chez les mammifères. Toutefois, la





**Figure 2 - Le disque imaginal de l'aile de *Drosophila***

**(A)** Représentation du disque de l'aile vu de côté. Les deux couches de cellules épithéliales sont distinctes mais jointes. La couche DP (Disc Proper) est composée de cellules épithéliales pseudostratifiées tandis que la couche PM (Peripodial membrane) est faite de cellules squameuses. La poche de l'aile colorée en rose deviendra l'aile de la mouche adulte. **(B)** Images confocales d'une coloration DAPI qui permet de visualiser les noyaux. La section Z montre clairement les deux couches du disque. Les vues *en face* permettent de visualiser la différence de morphologie entre la couche DP (dense) et PM (espacée).

recombinaison méiotique rend difficile le maintien d'une lignée. Pour contrecarrer ce problème, des chromosomes dits «balanceurs» ont été introduits. Cette méthode a été découverte au début du 20<sup>e</sup> siècle en irradiant des lignées de drosophiles avec des rayons X (Muller 1918). Ceci a eu pour effet de générer des inversions chromosomiques qui inhibent la recombinaison homologe. De plus, ces chromosomes balanceurs sont souvent létaux lorsqu'ils sont portés de façon homozygote. Ainsi, une lignée portant une mutation hétérozygote peut être maintenue en place par un balancier sur des générations (Beckingham, Armstrong et al. 2005). Finalement, ces chromosomes portent un marqueur produisant un phénotype observable pour faciliter le génotypage.

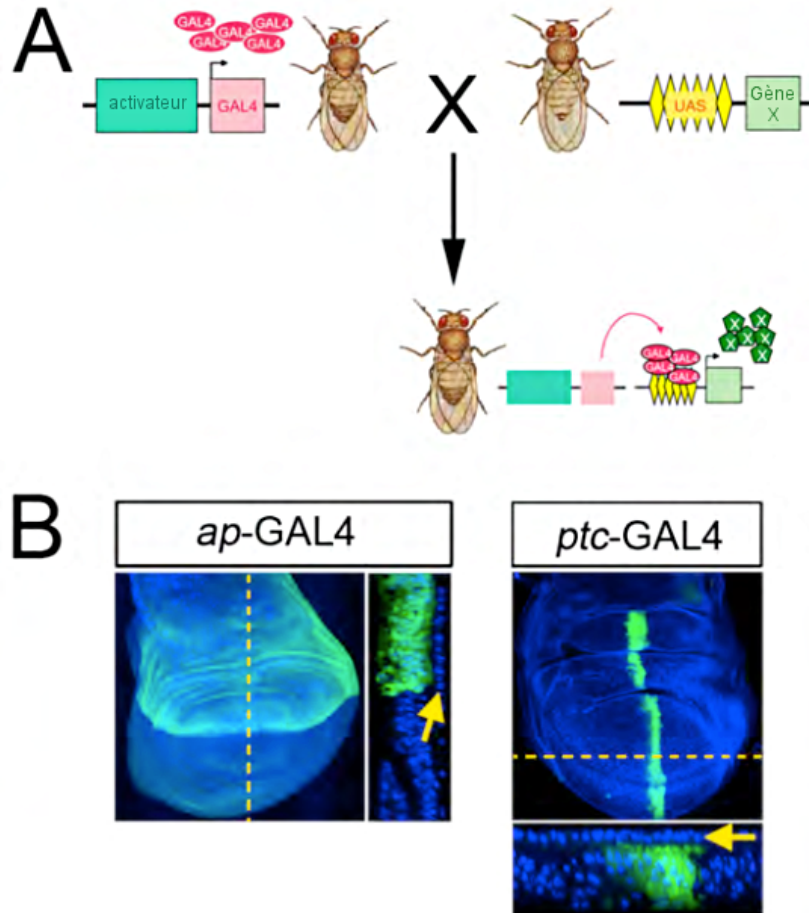
### 1.1.3.2 La transgénèse

La transgénèse, soit l'ajout de matériel génétique exogène dans un organisme, est à la base d'une grande partie de la recherche en génétique. Chez la drosophile, l'une des méthodes les plus utilisées se base sur les «éléments-P». Ceux-ci sont des transposons qui peuvent réarranger certains gènes de façon aléatoire (Spradling and Rubin 1982). Cette technique utilise donc la transposase P pour insérer un transgène dans le génome de la drosophile. Un gène rapporteur permettant d'identifier les mouches transgéniques est normalement utilisé. Une fois l'insertion complétée, il existe diverses techniques permettant de localiser le site d'insertion du transgène. Les éléments P sont efficaces lorsqu'on cherche à élucider la fonction de gènes inconnus par l'introduction de mutations, mais cette méthode est encombrante lorsqu'on veut introduire un gène connu pour pouvoir l'étudier *in vivo*. À cet effet, des techniques de transgénèse dirigée ont été développées. L'une d'entre-elles se base sur une intégrase de bactériophage nommé phiC31 (Bischof, Maeda et al. 2007). Cette enzyme permet d'insérer une séquence d'ADN à un site spécifique en se basant sur la reconnaissance de motifs *attB* / *attP*. Des lignées de drosophiles portant un site *attP* à un endroit connu ont été générées. Une séquence contenue dans un plasmide portant un site *attB* peut alors être injectée et intégrée dans le génome par l'intégrase de phiC31. Puisque cette insertion ne peut se produire que lorsque les

deux sites se rencontrent, cette technique garantit la localisation du transgène, ce qui est très utile lorsqu'on doit comparer différents mutants qui doivent être exprimés au même niveau. Le taux de transformation de cette méthode est également beaucoup plus grand que d'autres tel que celui des éléments P. Depuis, des systèmes tels que GAL4-UAS permettant de contrôler de façon spatiale et temporelle l'expression d'un gène d'intérêt ont été créés.

#### **1.1.3.3 Le système d'expression GAL4-UAS**

Le système GAL4-UAS (*Upstream Activation Sequence*) permet d'induire l'expression d'un gène de façon ciblée, c'est-à-dire dans un tissu spécifique. Développé en 1993, il se base sur l'utilisation d'un activateur transcriptionnel de la levure *S.cerevisiae* nommé GAL4 qui peut être exprimé de façon bénigne chez la drosophile. En effet, GAL4 ne cause pas de dommages apparents puisque son action principale est de se lier au site UAS qui est absent normalement (Brand and Perrimon 1993). Au fil du temps, des équipes ont inséré la séquence de GAL4 de façon aléatoire dans le génome de la drosophile pour générer des lignées dans lesquelles GAL4 est exprimé sous l'influence d'un activateur spécifique à un tissu en particulier. Puisque GAL4 seul ne produit pas de phénotype, il est préférable d'exprimer de façon concomitante un marqueur tel que GFP afin de pouvoir facilement identifier les adultes ayant le génotype désiré. Pour exprimer le transgène d'intérêt, on peut créer un plasmide dans lequel la séquence codante de ce gène se situe en aval d'un site UAS, puis injecter ce plasmide dans des embryons de drosophile. En croisant une lignée GAL4 à cette lignée UAS-transgène, les individus de la génération suivante exprimeront le transgène uniquement dans le tissu où GAL4 est présent (Fig. 3.A). Par exemple, l'activateur *apterous* (*ap*) induit l'expression uniquement dans la partie dorsale de la couche DP du disque imaginal de l'aile (Fig. 3.B). Avec ces motifs d'expression restreints, il est possible d'étudier des mutations qui seraient létales si elles étaient exprimées dans l'organisme en entier. Ce système permet aussi d'utiliser le tissu environnant en tant que contrôle négatif car le gène d'intérêt n'y est pas exprimé.



### Figure 3 - Le système GAL4-UAS

**(A)** Une lignée de *Drosophila* dans laquelle l'expression de GAL4 est sous le contrôle d'un activateur spécifique à un tissu est croisée à une lignée portant le gène d'intérêt (X) en aval d'une séquence UAS. La génération subséquente exprimera GAL4 qui ira se lier au UAS pour induire l'expression du gène d'intérêt dans un tissu spécifique. **(B)** À gauche : expression de GFP (vert) sous le contrôle de l'activateur *apterous* (*ap*) uniquement dans la section dorsale de la couche DP. Aucune expression dans la couche PM (flèche jaune). À droite : expression de GFP sous le contrôle de *patched* (*ptc*) dans la couche DP. Aucune expression dans la PM (flèche). Les noyaux sont colorés par DAPI (bleu).

#### **1.1.4 Conservation de gènes entre la drosophile et les mammifères**

L'utilisation de la drosophile comme modèle comporte l'avantage majeur d'avoir plusieurs mécanismes développementaux conservés chez l'humain. Les cellules épithéliales chez la mouche se répliquent par mitose de façon similaire aux cellules mammaliennes (Neto-Silva, Wells et al. 2009). L'étude du développement est intrinsèquement liée au cancer puisque la dérégulation de la croissance en est l'une des causes majeures (Hanahan and Weinberg 2000). En effet, plusieurs gènes ayant été identifiés en tant que proto-oncogènes chez les mammifères tels que myc et Ras1 ont été retrouvés chez la drosophile où ils jouent des rôles dans la croissance lors du développement (Johnston, Prober et al. 1999, Prober and Edgar 2000). Inversement, des promoteurs de la croissance chez la drosophile tels que Hippo (Harvey, Pflieger et al. 2003) ont des orthologues (Mst1/2) à l'étude chez les mammifères où ils sont maintenant considérés en tant que candidats oncogéniques (Song, Mak et al. 2010). Aussi, des liens entre le maintien de la structure de l'épithélium et la croissance identifiés chez la drosophile semblent être conservés chez les mammifères (Bilder, Li et al. 2000, Johnston 2009). En considérant ces faits, il est apparent que la drosophile est un excellent modèle pour étudier le développement mammalien. Plusieurs de ces processus doivent être finement contrôlés. À cette fin, une méthode largement utilisée par l'organisme est la phosphorylation par les protéines kinases. Celles-ci seront discutées en détail dans les prochaines sections.

### **1.2 Protéines kinases**

Les protéines kinases sont des enzymes impliquées dans la régulation de la majorité des processus biologiques. Ceci est spécialement apparent lorsqu'on considère que 2% de toutes les protéines sont des kinases (Manning, Whyte et al. 2002). En transférant le phosphate d'une molécule d'ATP à leurs substrats, elles peuvent contrôler divers processus tels que la croissance, la mort cellulaire et la différenciation entre autres. Naturellement, leur importance leur confère également le potentiel de causer de nombreuses maladies lorsqu'une dérégulation survient, dont notamment

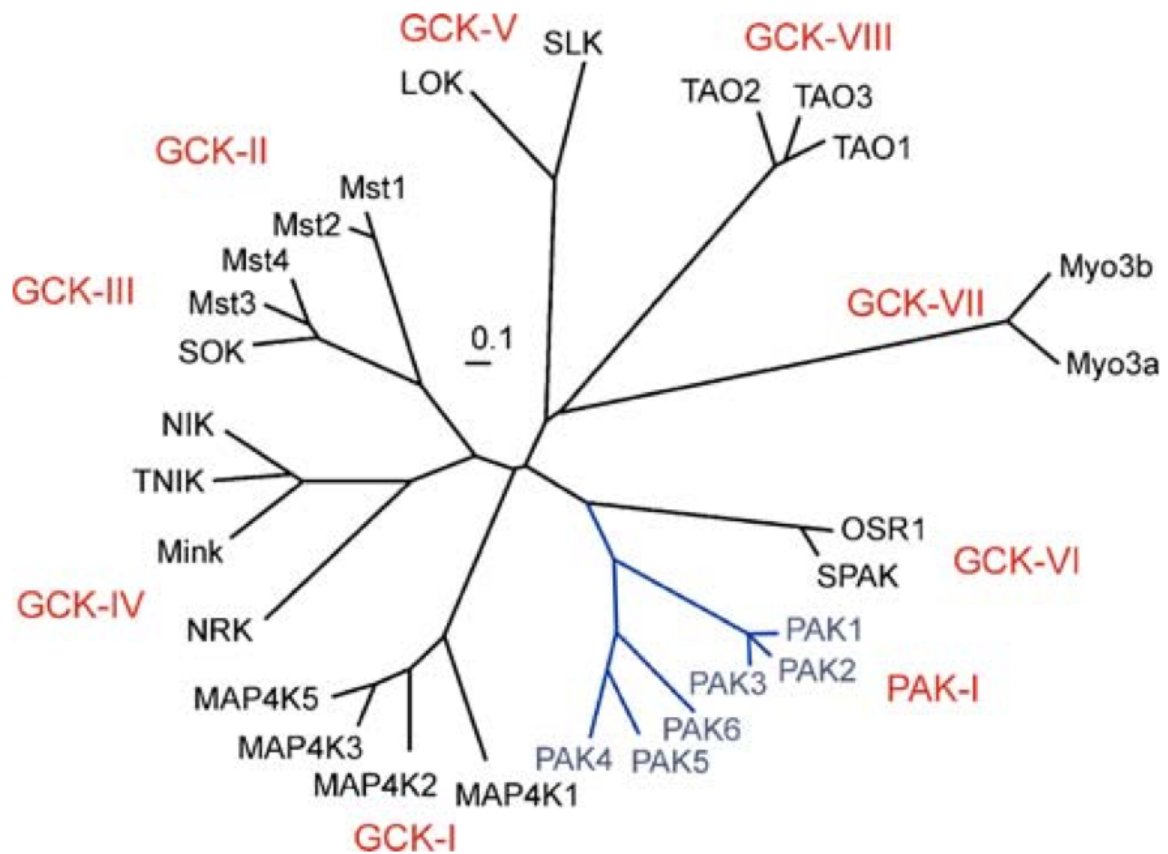
un cancer (Blume-Jensen and Hunter 2001). Les kinases peuvent être reconnues par leur domaine catalytique qui est souvent conservé (Hanks and Quinn 1991). Elles peuvent aussi être distinguées selon les résidus qu'elles sont susceptibles de phosphoryler. Chez les eukaryotes, la plupart des kinases sont spécifiques aux sérines et thréonines (Ser/Thr kinase), tandis que d'autres agissent sur les tyrosines (Tyr kinase) et certaines sur tous ces acides aminés (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998). À cause de leur rôle crucial dans les cellules, les kinases doivent être finement régulées. Plusieurs mécanismes existent, mais deux des principaux sont la phosphorylation et les interactions protéine-protéine (Nolen, Taylor et al. 2004). Ceci peut affecter la conformation de l'enzyme, ou encore sa localisation.

### **1.2.1 Les kinases Sterile-20**

Les kinases Sterile-20 (Ste20) sont une famille de Ser/Thr kinases qui ont un domaine catalytique homologue à la kinase Ste20p de la levure *S.cerevisiae*. Il existe 28 membres de ce groupe chez l'humain divisés en deux sous-familles, soit les «p21-Activated Kinases» (PAK) et les «Germinal Center Kinases» (GCK) (Delpire 2009). Le domaine kinase est en C-terminal pour les PAKs et en N-terminal pour les GCKs. On peut diviser ces kinases davantage selon leurs similarités (Fig. 4). Quelques kinases Ste20 ont été étudiées en profondeur. La sous-famille PAK a été impliquée en majeure partie dans la régulation du cytosquelette (Bokoch 2003) tandis que la branche GCK-II qui comprend les kinases de la voie de signalisation Hippo contrôle la croissance et la suppression de tumeurs (Pan 2010). Toutefois, certains membres de la famille Ste20 n'ont toujours pas été bien caractérisés.

#### **1.2.1.1 Études des kinases GCK-V chez les mammifères**

La branche GCK-V qui inclut les kinases SLK et LOK est parmi les moins bien comprises (Delpire 2009). Il a été démontré que SLK est exprimée largement dans plusieurs tissus chez les mammifères (Zhang, Hume et al. 2002) tandis que LOK est retrouvée surtout chez les lymphocytes (Kuramochi, Moriguchi et al. 1997). Cette dernière a été étudiée dans des souris LOK<sup>-/-</sup> ce qui a permis de démontrer un rôle



**Figure 4 - Arbre des kinases Ste20.**

Les 28 membres des kinases Ste20 divisés en deux familles (PAK et GCK) et en sous-familles selon la conservation du domaine kinase. (À partir de Delpire, 2009).

possible dans l'adhésion des lymphocytes, un processus important dans l'élimination de pathogènes (Endo, Toyama-Sorimachi et al. 2000). SLK a été étudiée plus en détail ce qui a permis de lui attribuer plusieurs rôles. Premièrement, une étude a démontré que SLK est requise en amont de Cdc2 pour progresser au travers de la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (O'Reilly, Wagner et al. 2005). Aussi, il a été démontré que SLK peut activer JNK1 et induire l'apoptose chez des fibroblastes en culture (Sabourin and Rudnicki 1999). De plus, SLK peut être activée par la voie de signalisation FAK/c-src/MAPK pour contrôler le renouvellement des adhésions focales au front de migration (Wagner, Flood et al. 2002). SLK semble également être impliquée dans la migration de cellules cancéreuses. En effet, une étude a prouvé qu'un récepteur tyrosine kinase fréquemment retrouvé dans le cancer du sein (HER2/ ErbB2/Neu) peut induire l'activation de SLK par la signalisation FAK, ce qui promeut à son tour la migration cellulaire (Roovers, Wagner et al. 2009). L'ensemble de ces études suggèrent qu'une multitude de procédés biologiques sont affectés par ces kinases. Par contre, la plupart de la recherche dans ce domaine a été faite dans des modèles de culture cellulaire, et un rôle physiologique clair pour SLK et LOK chez les mammifères n'a toujours pas émergé. Toutefois, des études de l'orthologue GCK-V chez la drosophile commencent à combler cette lacune.

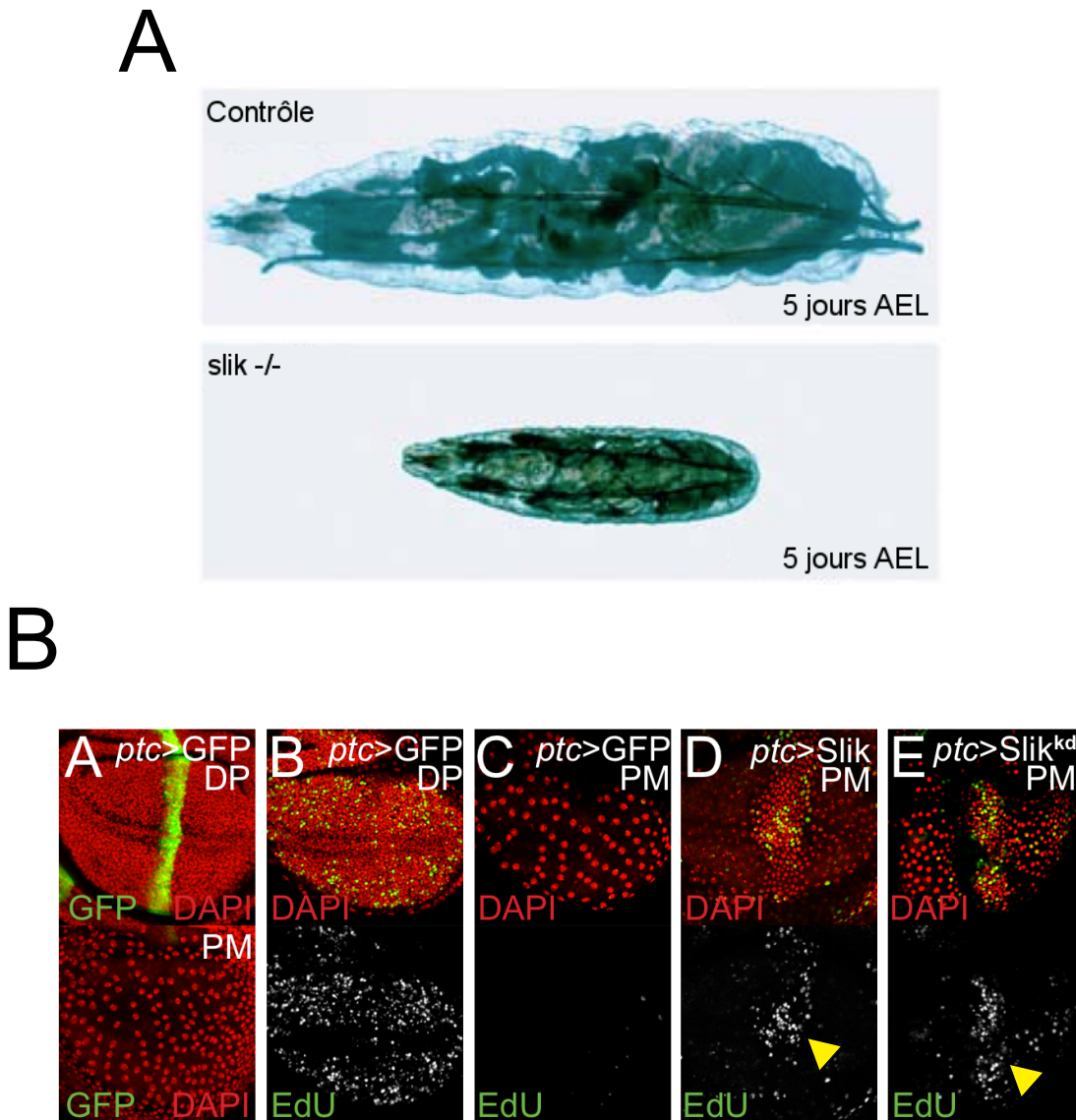
### **1.3 Les deux rôles de la kinase Ste20 Slik *in vivo***

Slik (*SLK- and LOK-like kinase*) a été identifiée en tant que seul orthologue GCK-V chez *Drosophila* lors d'un criblage visant à caractériser des régulateurs de la croissance. Cette kinase possède la structure typique des GCKs avec un domaine kinase conservé en N-terminal, une région centrale non-conservée et un domaine C-terminal conservé de type «coiled-coil» (Hipfner and Cohen 2003).

#### **1.3.1 Slik est impliquée dans la régulation de la croissance**

Puisque peu de choses sont connues sur le rôle de SLK et LOK, la première étape dans la caractérisation de Slik a été de générer des larves mutantes Slik (-/-). Il a été noté que celles-ci croissent beaucoup plus lentement que leurs pairs de type sauvage





**Figure 5 - Slik induit la croissance non-autonome sans activité kinase.**

(A) Croissance retardée d'une larve de drosophile *slik*<sup>-/-</sup> 5 jours après la ponte comparativement à une larve de type sauvage. (B) L'expression de GFP par *ptc* est visible par microscopie confocale dans la couche DP (A). Motif normal de prolifération à la couche DP (B) et aucune prolifération en PM (C) marqué par l'incorporation d'EdU. L'expression de Slik<sup>WT</sup> ou Slik<sup>KD</sup> en DP par *ptc* induit une prolifération non-autonome dans les cellules de la couche PM directement au-dessus (D et E), visible par la coloration de noyaux DAPI et l'incorporation d'EdU (flèches jaunes).

(Fig 5.A) et meurent avant d'atteindre le stade adulte (Hipfner and Cohen 2003). De plus, lorsque Slik est surexprimée dans les disques imaginaux de l'aile, la mouche adulte présente des ailes plus grandes. Cela correspond au fait que d'autres kinases Ste20 telles que Hippo (MST1/2) sont impliquées dans la régulation de la croissance (Pan 2010). Toutefois, puisque les larves mutantes pour Slik peuvent quand même croître, ceci suggère que Slik n'est pas absolument requise et qu'elle contrôle plutôt le taux de croissance. Au niveau cellulaire, un phénomène particulier peut être observé lorsqu'on exprime Slik à l'aide du système GAL4-UAS. Tel qu'attendu, les cellules qui surexpriment la kinase prolifèrent, mais les cellules avoisinantes qui ne surexpriment pas Slik se multiplient également. Ce phénomène est nommé «prolifération non-autonome» et dépend probablement de l'émission d'un ou plusieurs signaux déclenchés par Slik. Ceux-ci sont jusqu'ici inconnus et doivent pouvoir agir de façon autocrine mais aussi paracrine.

#### **1.3.1.1 La croissance induite par Slik ne dépend pas de son activité kinase**

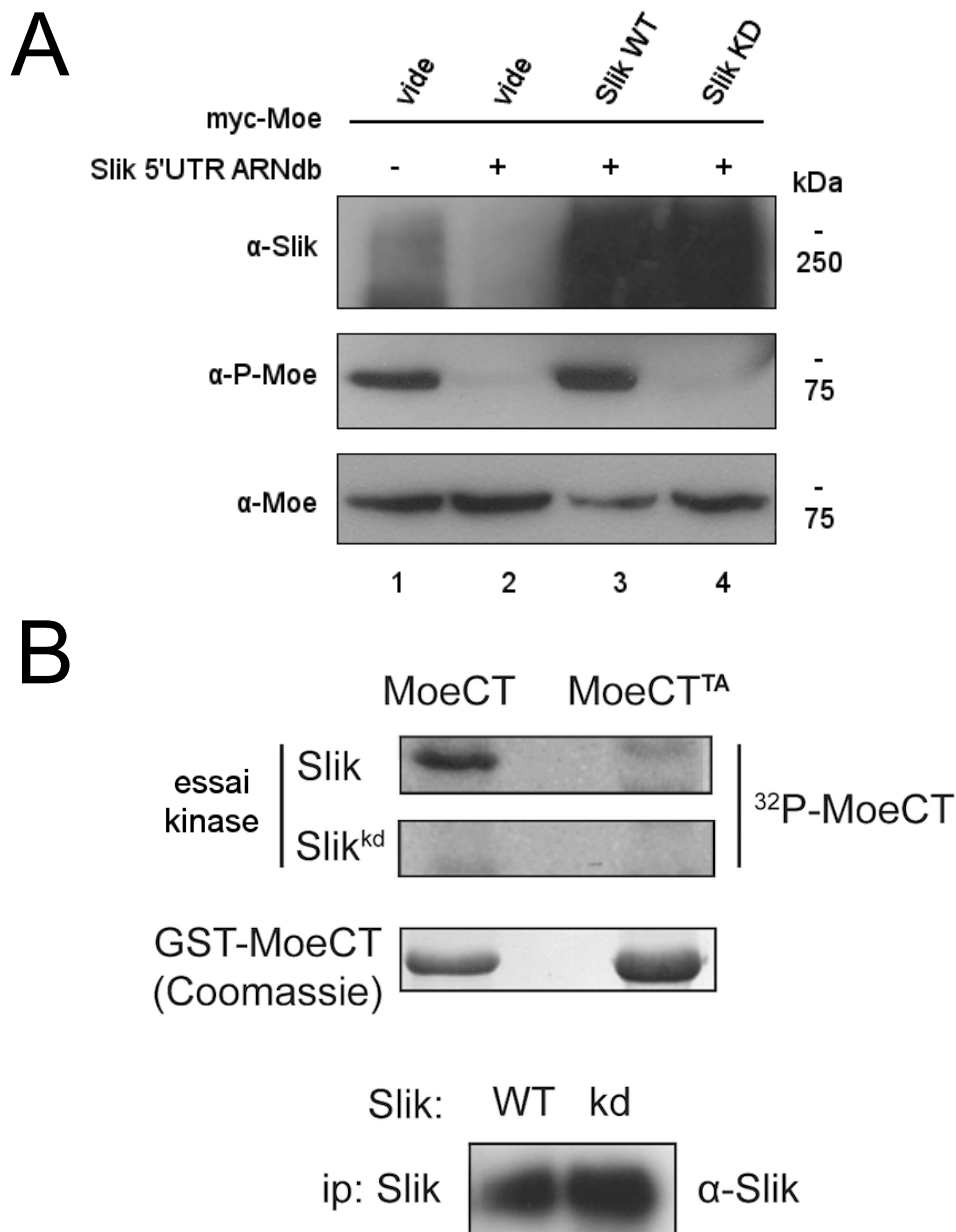
Des protéines peuvent être exprimées de façon spécifique à un tissu avec la méthode GAL4-UAS et un activateur comme *ptc* qui induit l'expression en une ligne dans la couche DP (Fig. 5.B.A). Lorsque Slik est exprimée par l'activateur *ptc* dans le disque imaginal de l'aile, les cellules de la couche PM directement au-dessus prolifèrent également tel qu'indiqué par une grande densité de noyaux et par le signal EdU, un analogue de la thymidine incorporé lors de la réplication de l'ADN (Fig. 5.B.D). Des échanges entre les deux couches ont déjà été observés, mais ils relevaient plutôt de la régulation de la composition de l'épithélium et non de la prolifération (Atkins and Mardon 2009). Ceci représente donc un nouveau mécanisme de régulation de la croissance. Un autre fait intéressant est que cette prolifération non-autonome ne semble pas dépendre de l'activité kinase de Slik. En mutant le résidu Asp<sup>176</sup> de Slik pour une Asn, on obtient une version catalytiquement inactive de la kinase (Slik<sup>KD</sup>). En exprimant cette dernière dans des disques de l'aile, une prolifération identique à celle induite par Slik<sup>WT</sup> est observée (Fig. 5.B.E). Des interactions protéine-protéine sont un mécanisme probable dans ce cas.

### **1.3.2 Slik phosphoryle Moesin pour promouvoir l'intégrité épithéliale**

Au cours du développement, la préservation des structures nécessaires au bon fonctionnement d'un organisme passe par de multiples effecteurs. Plusieurs études tendent à démontrer qu'une organisation cellulaire stricte est requise pour permettre aux tissus de croître. En effet, il a été démontré que des protéines qui contrôlent la prolifération peuvent également être impliquées dans d'autres processus tels que la polarisation et l'adhésion (Huang and Ingber 1999, Bilder, Li et al. 2000). Aussi, les kinases Sterile-20 ont été impliquées dans la régulation du cytosquelette (Dan, Watanabe et al. 2001). Le deuxième rôle de Slik dans le maintien de l'intégrité épithéliale par la phosphorylation de Moesin est mis en évidence ci-dessous (Hipfner, Keller et al. 2004).

#### **1.3.2.1 Les protéines ERM**

Les protéines ERM (Ezrin / Radixin / Moesin) forment une famille hautement conservée au travers des espèces. En effet, les domaines N et C terminaux présentent une conservation de plus de 75% (Fievet, Louvard et al. 2007). Les mammifères expriment les trois paralogues, mais d'autres organismes tels que la drosophile n'ont qu'une protéine ERM qui a été nommée Moesin de façon arbitraire. Le rôle principal de ces protéines est de faire le lien entre le cytosquelette d'actine et certaines protéines membranaires telles que CD44, ce qui aide à l'organisation épithéliale et à la structure cellulaire (Tsukita, Oishi et al. 1994). Ceci est possible grâce au domaine N-terminal des ERMs qui contient un domaine FERM leur permettant d'interagir avec d'autres protéines et une région de liaison à l'actine en C-terminal (Turunen, Wahlstrom et al. 1994, Reczek and Bretscher 1998). La majeure partie des ERMs sont présentes dans une forme inactive dans laquelle ces deux domaines interagissent (Gary and Bretscher 1995). Le mécanisme d'activation des protéines ERM passe par la phosphorylation d'un résidu conservé du domaine C-terminal. Ceci induit un changement de conformation qui libère les deux domaines fonctionnels pour leur permettre d'interagir avec leurs partenaires respectifs (Matsui, Maeda et al. 1998).



**Figure 6 - Slik phosphoryle Moesin.**

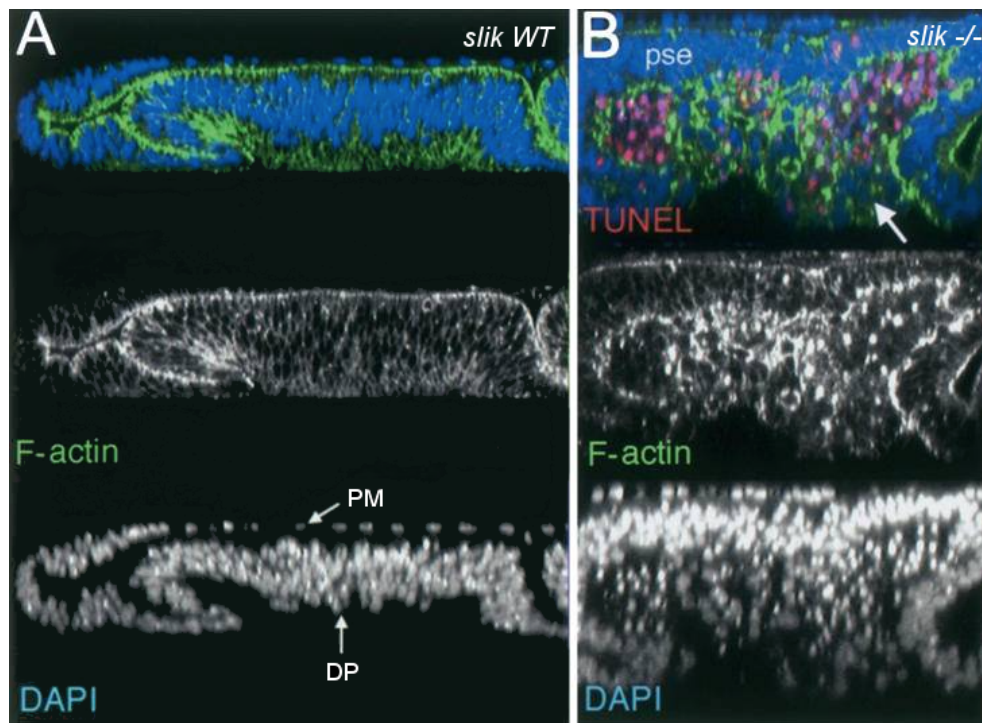
**(A)** Immunobuvardage d'extraits de cellules S2-R+ exprimant différentes formes de Slik. Lorsque la forme endogène de Slik est déplétée par ARNi, il y a perte de phosphorylation de Moesin (2, milieu). Cette phosphorylation est rétablie par l'expression de Slik<sup>WT</sup> (3) mais pas par Slik<sup>KD</sup> (4). **(B)** Autoradiogramme d'un essai kinase montrant la capacité de Slik<sup>WT</sup> de phosphoryler directement le résidu Thr<sup>556</sup> de la région C-terminale de Moesin (MoeCT). MoeCT<sup>TA</sup> rend ce résidu non-phosphorylable. Slik<sup>KD</sup> ne phosphoryle pas Moesin. Les panneaux du bas montrent la quantité de substrat GST-Moe et le niveau d'expression de Slik<sup>WT</sup> et Slik<sup>KD</sup>.

#### 1.3.2.1 Slik est la kinase qui phosphoryle Moesin chez la drosophile

En étudiant Slik dans le contexte de la régulation de la croissance, Hipfner *et al.* ont constaté que des mutants pour Slik présentaient un phénotype similaire à des mutants ayant un défaut d'activation de la seule ERM de la drosophile, Moesin (Hipfner, Keller et al. 2004). Puisque cette dernière doit être phosphorylée pour être activée, ils ont émis l'hypothèse que Slik phosphoryle Moesin. Plusieurs expériences l'ont confirmé. Par exemple, lorsqu'on déplete Slik des cellules S2-R+ de drosophile par ARNi, on observe une forte diminution de la phosphorylation de Moesin (Fig. 6.A colonne 2). Ceci peut être observé grâce à un anticorps phospho-spécifique ciblé au résidu de régulation de Moesin (Thr<sup>556</sup>). On peut rétablir cette phosphorylation en exprimant le contenu d'un plasmide codant pour une forme sauvage de Slik qui n'est pas affectée par le «knockdown» (Slik<sup>WT</sup>, Fig. 6.A colonne 3). De plus, l'expression d'une forme catalytiquement inactive de Slik (Slik<sup>KD</sup>) ne peut pas rétablir la phosphorylation de Moesin (Fig. 6.A colonne 4). Pour prouver que ce processus est direct, une expérience similaire a été conduite dans un contexte *in vitro* où on mesure la phosphorylation par l'incorporation de phosphate radioactif. La forme sauvage de Slik peut phosphoryler directement le résidu Thr<sup>556</sup> car un signal est détecté pour la région C-terminale de Moesin (MoeCT) mais non pour la même région de Moesin portant une mutation T556A (MoeCT<sup>TA</sup>) (Fig. 6.B. en haut). Finalement, Slik<sup>KD</sup> ne phosphoryle aucune des deux formes de Moesin, tel qu'attendu. Pris ensemble, ces résultats démontrent clairement que Slik est la kinase qui active Moesin. Ceci confère à Slik un deuxième rôle dans le maintien de l'épithélium, ce qui est illustré ci-dessous.

#### 1.3.2.2 L'intégrité épithéliale

Le tissu épithélial requiert la mise en place de structures permettant une organisation stricte des cellules le composant. Par exemple, les protéines ERM participent à ce rôle en stabilisant l'actine corticale pour permettre la formation de jonctions *adherens*, une composante clé de l'épithélium (Fehon, McClatchey et al. 2010). Pour observer le lien entre Moesin et le maintien de l'intégrité épithéliale, les disques imaginaux de l'aile de la drosophile peuvent être utilisés (Fig. 7). Dans un disque provenant d'une



### Figure 7 - Slik est un promoteur de l'intégrité épithéliale

(A) Coupe transversale d'un disque imaginal d'une aile de type sauvage. La coloration DAPI permet d'observer les couches épithéliales PM (squameuse) et DP (pseudostratifiée). L'actine (en vert) est enrichie aux domaines apicaux. (B) Disque mutant *Slik*<sup>-/-</sup> illustrant une perte d'intégrité épithéliale. Les cellules apoptotiques sont marquées par TUNEL en rouge. L'épithélium pseudostratifié (pse) de la couche DP est mince, les cellules ont tendance à migrer à l'extérieur de leur emplacement normal (flèche). Figure adaptée de Hipfner, 2004.

mouche sauvage, les deux couches épithéliales PM et DP peuvent facilement être observées à l'aide d'une coloration DAPI. On remarque aussi que l'actine est concentrée aux domaines apicaux des cellules (Fig. 7.A en vert). Lorsqu'on observe le disque de l'aile d'une mouche n'exprimant pas Slik, un phénomène nommé «perte d'intégrité épithéliale» peut être noté (Fig. 7.B). Ce dernier est aussi présent dans des drosophiles mutantes pour Moesin (Speck, Hughes et al. 2003). Les couches épithéliales passent à un arrangement en plusieurs couches. Les cellules tendent à sortir de leur emplacement normal et à migrer. Certaines entrent alors en apoptose tel qu'illustré par une coloration TUNEL qui est sensible à des bris dans l'ADN (Fig. 7.B en rouge). Toutefois, cette migration semble être due à un défaut d'intégrité épithéliale et non à l'apoptose car certaines cellules migratrices ne sont pas colorées par TUNEL (Fig. 7.B flèche). Une autre observation intéressante est que certaines cellules semblent effectuer une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et développent des filopodes leur conférant une certaine mobilité (Hipfner, Keller et al. 2004). Ceci est un phénomène bien connu en oncologie, et il est essentiel à la création de métastases (Chaffer and Weinberg 2011). Mis à part l'intégrité épithéliale, d'autres mécanismes déréglés dans le cancer dépendent de l'action de ERMs. Durant la division cellulaire, Moesin est requise pour orienter le fuseau mitotique correctement ce qui est essentiel au bon déroulement de la mitose (Carreno, Kouranti et al. 2008). De plus en plus de liens entre les protéines ERM et certains cancers épithéliaux émergent, ce qui illustre l'importance du maintien de l'épithélium (Clucas and Valderrama 2014). Chez les mammifères, la déplétion des kinases GCK-V cause également une réduction de la phosphorylation des ERMs (Viswanatha, Ohouo et al. 2012, Machicoane, de Frutos et al. 2014). Conséquemment, des défauts engendrés par une mutation des GCK-V sont aussi à la base de phénotypes semblables à ceux observés chez des mutants de ERMs mammaliens. Par exemple, la formation de microvillus à base d'actine au domaine apical de certains tissus épithéliaux est compromise, et ceci cause plusieurs problèmes dont une malformation du système digestif (Casaletto, Saotome et al. 2011). Les GCK-Vs semblent donc être des acteurs clés dans le maintien des tissus épithéliaux.

## **1.4 Régulation des kinases Sterile-20**

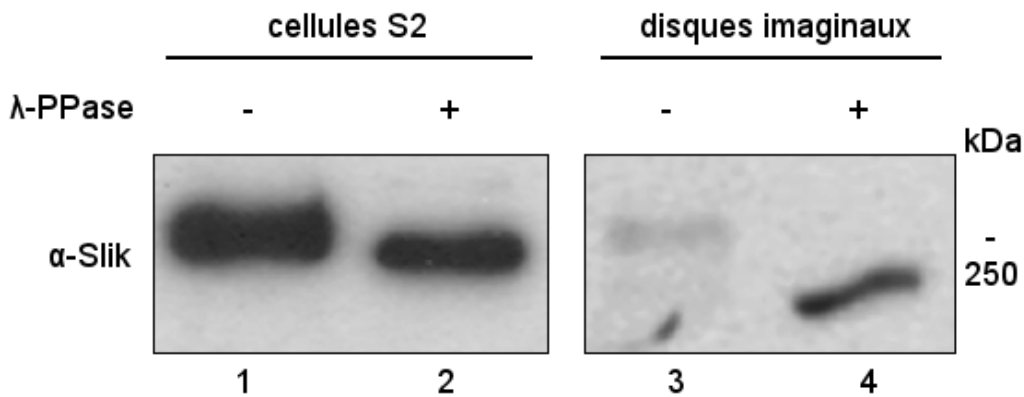
Avec leurs multiples rôles dont la régulation de la croissance, du cytosquelette et de la division cellulaire, les kinases Ste20 doivent être strictement contrôlées. Plusieurs d'entre-elles se basent sur un mécanisme d'interactions protéine-protéine. Ceci a souvent pour effet d'activer la kinase (Lamson, Winters et al. 2002) ou de recruter la kinase à un endroit où elle est requise (Arnold, Patzak et al. 2005, Winters and Pryciak 2005). L'autre principal mécanisme de contrôle est la phosphorylation réversible d'une région spécifique de la kinase. Cette région conservée de 20 à 35 acides aminés est nommée «segment d'activation». La phosphorylation de résidus spécifiques dans cette section entraîne la stabilisation du domaine kinase ce qui la rend catalytiquement active (Nolen, Taylor et al. 2004). Plusieurs kinases Ste20 s'activent elle-mêmes par autophosphorylation (Fig. 8.A en vert). La mutation des résidus phosphorylables importants pour l'activation à des résidus non-phosphorylables entraîne une baisse de l'activité kinase (Benner, Dennis et al. 1995, Wu, Whiteway et al. 1995, Gatti, Huang et al. 1999, Lim, Lennard et al. 2003, Praskova, Khoklatchev et al. 2004, Arnold, Patzak et al. 2005). Également, des résidus de cette même section peuvent être phosphorylés par d'autres protéines selon un processus de *trans*-phosphorylation (Fig. 8.A en rouge), et certaines kinases Ste20 combinent ces deux types de phosphorylation (King, Gardiner et al. 2000, Yu, Riou et al. 2001, Zhou, Zhuo et al. 2003, Li, Hu et al. 2004, Vitari, Deak et al. 2005). La régulation des kinases GCK-V est mal comprise, mais il est apparent que la phosphorylation est impliquée. L'activation de SLK est au moins en partie causée par une phosphorylation des résidus T183 et S189 du segment d'activation (Luhovy, Jaber et al. 2012). L'alignement de ce segment pour les GCK-V révèle quatre résidus phosphorylables conservés (Fig. 8.A en bleu). D'autres mécanismes sont probables, comme par exemple l'homodimérisation qui est entre autres observée chez SLK (Delarosa, Guillemette et al. 2011). Chez la drosophile, il est vraisemblable que Slik soit régulée par la phosphorylation d'un ou plusieurs des résidus conservés chez ses orthologues mammaliens. Hipfner *et al.* ont fourni un indice prometteur en démontrant que Slik est une phosphoprotéine *in vivo*. En isolant Slik soit à partir de cellules S2 ou



**A**

		VII		VIII
STE20p	-	DFGFCAQI-----NELNLKRTTMVGT	TPYWMAPE	
OSR1	-	DFGVSAFLATGGDITRNKVRK	TFVGTPCWMAPE	
SPAK	-	DFGVSAFLATGGDVTRNKNRKT	TFVGTPCWMAPE	
PAK1	-	DFGFCAQI-----TPEQSKRST	TMVGTPYWMAPE	
PAK2	-	DFGFCAQI-----TPEQSKRST	TMVGTPYWMAPE	
MST1	-	DFGVAGQL-----TDTMAKRNT	TVIGTPFLMAPE	
MST2	-	DFGVAGQL-----TDTMAKRNT	TVIGTPFWMAPE	
Hippo	-	DFGVAGQL-----TDTMAKRNT	TVIGTPFWMAPE	
hMINK	-	DFGVSAQL-----DRTVGRRNT	TFIGTPYWMAPE	
HPK1	-	DFGISAQI-----GATLARRLS	FIGTPYWMAPE	
SLK	-	DFGVSAKN-----TRTIQRRDS	FIGTPYWMAPE	
LOK	-	DFGVSAKN-----LKTLLQKRDS	FIGTPYWMAPE	
Slik	-	DFGVSAKN-----KHTMQKHDT	FIGTPYWMAPE	

**B**



**Figure 8 - Slik est une phosphoprotéine *in vivo*.**

**(A)** Alignement de boucles d'activation de kinases Ste20 situées entre les sous-domaines VII et VIII. Les résidus en vert sont autophosphorylés, les rouges sont *trans*-phosphorylés et ceux en gras sont importants pour l'activation de la kinase. Les résidus phosphorylables conservés chez Slik et ses orthologues mammaliens SLK et LOK sont en bleu. **(B)** Immunobuvardage de type Western montrant un changement de mobilité électrophorétique de Slik en réponse à un traitement à la  $\lambda$ -phosphatase. Les échantillons ont été extraits de cellules S2 ou de disque imaginaux de l'aile de la drosophile. Gel d'acrylamide 6%.

de disques imaginaires, ils ont pu faire un traitement à la  $\lambda$ -phosphatase. En effectuant un immunobuvardage de type Western, ils ont constaté que les échantillons traités ont une plus grande mobilité électrophorétique que le contrôle (Fig. 8.B). Ceci est causé par la perte de groupements phosphate. Mis à part l'activation de la kinase, il est probable que la modulation de sa localisation soit également un mécanisme de contrôle. Il a été démontré que Sip1, l'orthologue de EBP50 (*ERM binding protein 50*) chez la drosophile peut interagir avec Slik et Moesin pour les co-localiser et ainsi faciliter l'activation de Moesin. En effet, la localisation de Slik et la phosphorylation de Moesin sont perdus à certains stades du développement dans des cellules mutantes pour Sip1 (Hughes, Formstecher et al. 2010). Ces études ont fourni la base du projet détaillé dans ce mémoire. La kinase Slik est impliquée dans la régulation de la croissance, mais également dans le maintien du cytosquelette. Ces deux fonctions sont distinctes et doivent être précisément contrôlées. Un mécanisme de phosphorylation est probablement impliqué, mais peu de choses sont connues sur la régulation de cette kinase.

## 2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Le contrôle de l'activité des kinases est un processus important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ceci est évident lorsqu'on considère par exemple que la kinase Slik peut moduler non seulement la croissance, mais aussi le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux. Il a été démontré que plusieurs kinases Ste20 dont SLK sont régulées par phosphorylation. En se basant sur les connaissances actuelles concernant la famille GCK-V, nous proposons comme hypothèse que Slik est régulée par phosphorylation. Ce projet vise à répondre à trois objectifs, soit :

### **2.1 Chercher des sites de phosphorylation chez Slik.**

Certaines régions des kinases sont souvent impliquées dans leur mécanisme de contrôle. Nous avons caractérisé les sites de phosphorylation de Slik afin de guider les expériences subséquentes.

### **2.2 Déterminer quels résidus sont importants pour l'activation de Slik.**

En se basant sur la littérature, des mutants de Slik ont été utilisés afin de caractériser l'importance de sites potentiels de phosphorylation pour l'activité catalytique de la kinase.

### **2.3 Étudier l'importance de ces mêmes résidus pour la prolifération cellulaire non-autonome induite par Slik.**

Il a été démontré que la prolifération causée par Slik n'est pas dépendante de son activité kinase. Il n'est pas clair si la kinase doit être activée pour causer ce phénotype. Nous avons utilisés les mêmes mutants de Slik pour étudier la régulation de ce processus.

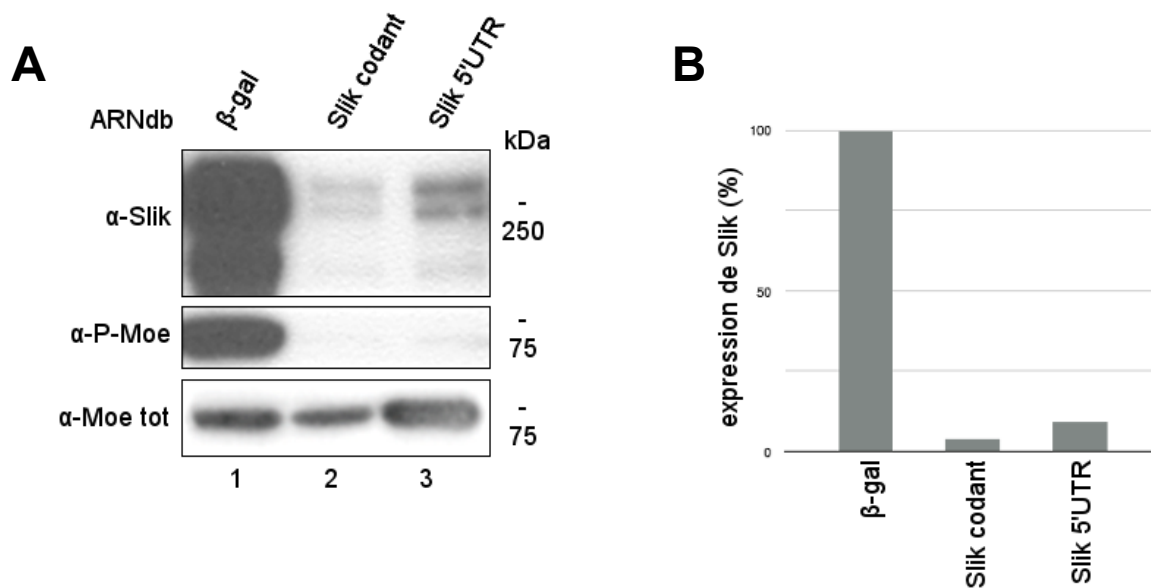
## 3. RÉSULTATS

### **3.1 Les sites de phosphorylation de Slik.**

Une grande proportion des kinases de la famille Ste20 sont régulées par phosphorylation. Cette méthode de contrôle permet de stabiliser le domaine kinase de ces protéines, leur permettant ainsi de jouer leur rôle catalytique. Les résidus qui doivent être phosphorylés se trouvent souvent dans le segment d'activation du domaine kinase. Un alignement de kinases Ste20 révèle une haute conservation de ce segment. Spécifiquement, quatre résidus phosphorylables sont présents chez Slik et ses orthologues mammaliens (Fig. 8.A). Deux mécanismes d'ajout de phosphates existent, soit l'auto- et la *trans*-phosphorylation. Nous savons que Slik est une phosphoprotéine *in vivo* (Fig. 8.B). Notre premier objectif était donc de déterminer quels résidus de Slik sont phosphorylés, et quel mécanisme est impliqué (auto- v.s. *trans*-phosphorylation).

#### **3.1.1 L'ARNdb Slik 5'UTR permet de dépléter la forme endogène de Slik sans affecter les mutants.**

Pour pouvoir étudier le processus de régulation de Slik, il est essentiel de pouvoir empêcher l'expression de la forme endogène de la kinase. En effet, un changement produit par une mutation de Slik serait probablement invisible si la kinase sauvage était présente pour compenser. À cet effet, nous avons produit un ARNdb visant la région 5' non-traduite (UTR) de Slik. Cette molécule est nécessaire pour une méthode nommée «interférence par ARN» (ARNi). Une fois introduite dans des cellules S2 de drosophile, cet ARNdb est clivé par l'enzyme Dicer et les fragments résultants sont conjugués au complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Ce dernier ira se lier à un ARN messager reconnu par le fragment d'ARNi et le dégradera, empêchant ainsi l'expression de la protéine encodée (Fire, Xu et al. 1998, Lee, Nakahara et al. 2004). La région 5'UTR est requise pour l'expression de la forme endogène de Slik, mais les mutants utilisés dans ce projet n'en ont pas besoin, et ne sont donc pas affectés par cette méthode. L'utilisation d'un ARNdb non-spécifique ( $\beta$ -



**Figure 9 - « Knockdown » de Slik.**

**(A)** Immunobuvardage de type Western montrant les différentes options pour le « knockdown » de la forme sauvage de Slik<sup>WT</sup>. Les cellules ont été traitées avec de l'ARNdb β-gal (contrôle -), de l'ARNdb Slik codant (contrôle +) ou de ARNdb visant la région 5' non traduite (UTR) de l'ARNm de Slik<sup>WT</sup>. Gel 6% acrylamide. **(B)** Quantification en pourcentage de l'expression de Slik lors de l'immunobuvardage de type Western en A. Le niveau maximal a été placé arbitrairement à la colonne 1 (contrôle -). L'ARNdb Slik 5'UTR est aussi efficace que l'ARNdb Slik codant pour la déplétion de la kinase.

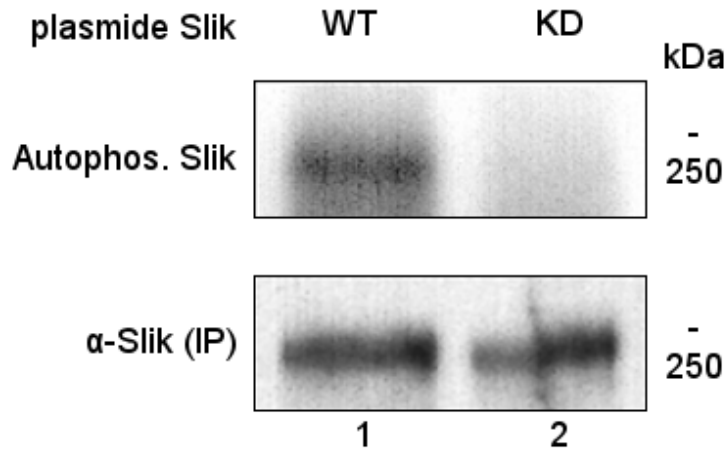
gal) n'affecte pas Slik, tandis que des cellules traitées avec un ARNdb visant la région codante de la kinase présentent une déplétion quasi totale de Slik et une réduction concomitante de la phosphorylation de son substrat Moesin. L'ARNdb Slik 5'UTR cause une réduction semblable, démontrant ainsi son utilité pour les expériences qui requièrent l'expression de mutants de Slik (Fig. 9).

### 3.1.2 Slik est auto- et *trans*-phosphorylée

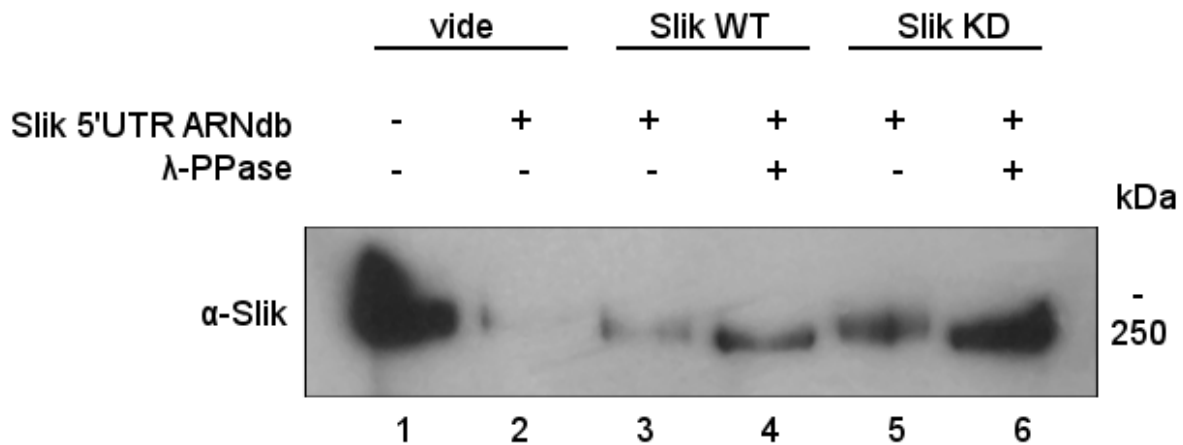
Puisque Slik est une phosphoprotéine, nous avons tenté de discerner quel mécanisme de phosphorylation est impliqué. L'orthologue mammalien SLK peut s'autophosphoryler, ce qui suggère que Slik pourrait également le faire (Luhovy, Jaber et al. 2012). Slik<sup>WT</sup> a été exprimée dans des cellules S2 puis purifiée par immunoprécipitation. En incubant celle-ci *in vitro* avec de l'ATP radioactif puis en effectuant un autoradiogramme, on observe qu'elle a incorporé du <sup>32</sup>P, démontrant ainsi que Slik peut s'autophosphoryler (Fig. 10.A). De plus, la même expérience effectuée avec sa forme catalytique inactive (Slik<sup>KD</sup>) ne produit aucun signal, ce qui confirme la spécificité de l'expérience.

Certaines kinases Ste20 peuvent être activées par *trans*-phosphorylation, particulièrement aux résidus qui correspondent à la T<sup>192</sup> de Slik (Fig. 8.A). Pour vérifier la présence de ce mécanisme chez Slik, nous avons exprimé Slik<sup>WT</sup> ou Slik<sup>KD</sup> dans des cellules S2 déplétées de la forme endogène de la kinase par ARNi. Ensuite, ces formes de Slik ont été purifiées par immunoprécipitation et la moitié des échantillons résultants ont été traités *in vitro* avec la λ-phosphatase pendant 30 minutes. Suite à cette étape, un immunobuvardage de type Western a été effectué. La perte de groupements phosphate augmente la mobilité électrophorétique de Slik, ce qui est facilement observable car le gel utilisé contient du PhosTag® qui réduit la mobilité de protéines phosphorylées. Un décalage est observé pour Slik<sup>WT</sup>, ce qui était attendu puisque la kinase peut s'autophosphoryler. Toutefois, un décalage similaire est visible pour Slik<sup>KD</sup> (Fig 10.B). Puisque cette dernière ne peut pas s'autophosphoryler et que les cellules utilisées n'avaient presque pas de Slik endogène, un mécanisme de *trans*-phosphorylation doit également exister.

**A**



**B**



**Figure 10 - Auto- et *trans*-phosphorylation de Slik *in vitro*.**

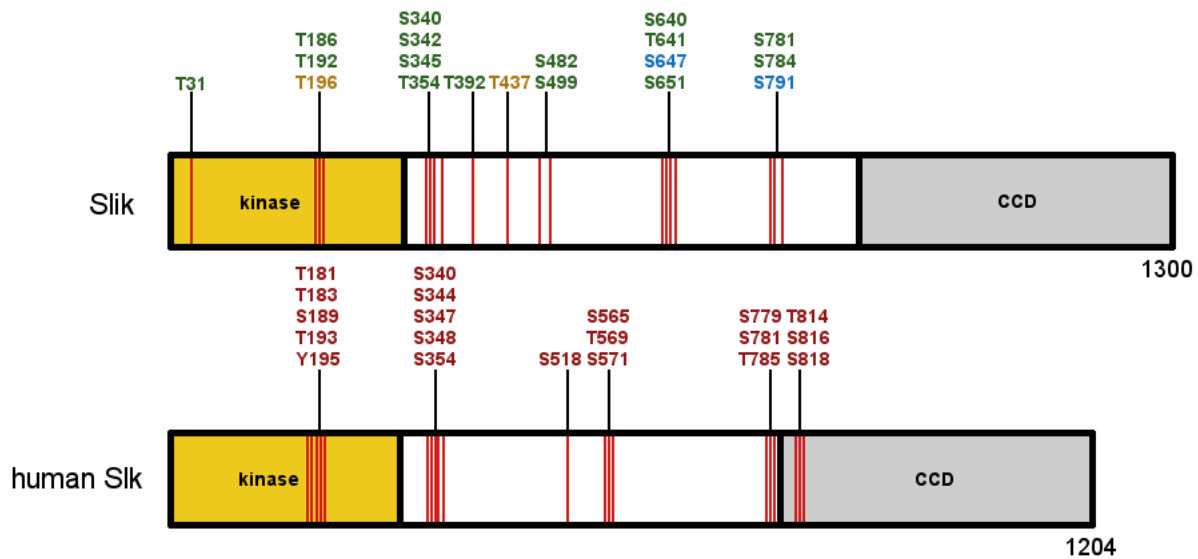
**(A)** Essai kinase *in vitro* montrant la capacité de Slik de s'autophosphoryler en présence de [<sup>32</sup>P] ATP. La rangée du haut montre un autoradiogramme de la forme sauvage de Slik (WT) qui incorpore le <sup>32</sup>P tandis que la forme catalytiquement inactive (KD) ne le fait pas. La rangée du bas montre un immunobuvardage de type Western qui correspond à la quantité de protéines immunoprécipitées (contrôle). **(B)** Immunobuvardage de type Western montrant un changement de mobilité électrophorétique de la forme sauvage de Slik (Slik<sup>WT</sup>) ou catalytiquement inactive (Slik<sup>KD</sup>). Celles-ci ont été immunoprécipitées à partir de cellules S2-R+ et incubées *in vitro* avec la λ-phosphatase (30mins, 30°C). Gel 6% acrylamide + 5μL PhosTag.

### 3.1.3 Carte des sites de phosphorylation de Slik

La kinase Slik est divisée en trois domaines soit : le domaine kinase en N-terminal typique des GCK, un domaine de liaison non-conservé et un domaine C-terminal de type CCD (*Coiled Coil Domain*). Afin de déterminer comment Slik est régulée, nous avons effectué des analyses par chromatographie liquide / spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Ceci nous renseigne sur la position des résidus phosphorylés. Une attention spéciale a été accordée au segment d'activation contenu entre les motifs conservés Asp-Phe-Gly (DFG) et Ala-Pro-Glu (APE). Pour plusieurs kinases, celui-ci doit être phosphorylé à certains de ses résidus pour qu'elles soient actives (Nolen, Taylor et al. 2004).

Les échantillons ont été purifiés par immunoprécipitation à partir de cellules S2 et du troisième stade larvaire de drosophiles. Ils ont ensuite été digérés avec la trypsine et analysés par un spectromètre de masse. Les données ont finalement été traitées avec le logiciel Mascot et les résultats ont été rapportés sur un schéma de Slik qui est à l'échelle (Fig. 11). Au total, 19 sites de phosphorylation ont été identifiés. De ceux-ci, 2 ont été retrouvés uniquement dans les cellules S2 (en jaune), 2 dans les larves de drosophile (en bleu) et 15 dans les deux échantillons (en vert). Nous avons comparés nos résultats aux sites de phosphorylation les plus couramment retrouvés chez l'un des orthologues mammaliens de Slik, SLK. Les informations ont été recueillies dans la base de données PhosphoSite Plus (Hornbeck, Chabra et al. 2004). En posant comme critère un minimum de 3 observations indépendantes par site, nous avons trouvé 20 résidus phosphorylés pour SLK. Deux groupes de résidus conservés intéressants sont ressortis de cette analyse. Le premier se situe dans le segment d'activation, soit T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> chez Slik. Le deuxième est composé des résidus S<sup>340</sup>, S<sup>342</sup>, S<sup>345</sup> et T<sup>354</sup> et se situe tout juste à l'extérieur du domaine kinase. Les autres sites de phosphorylation de Slik sont situés dans la région de liaison non-conservée.





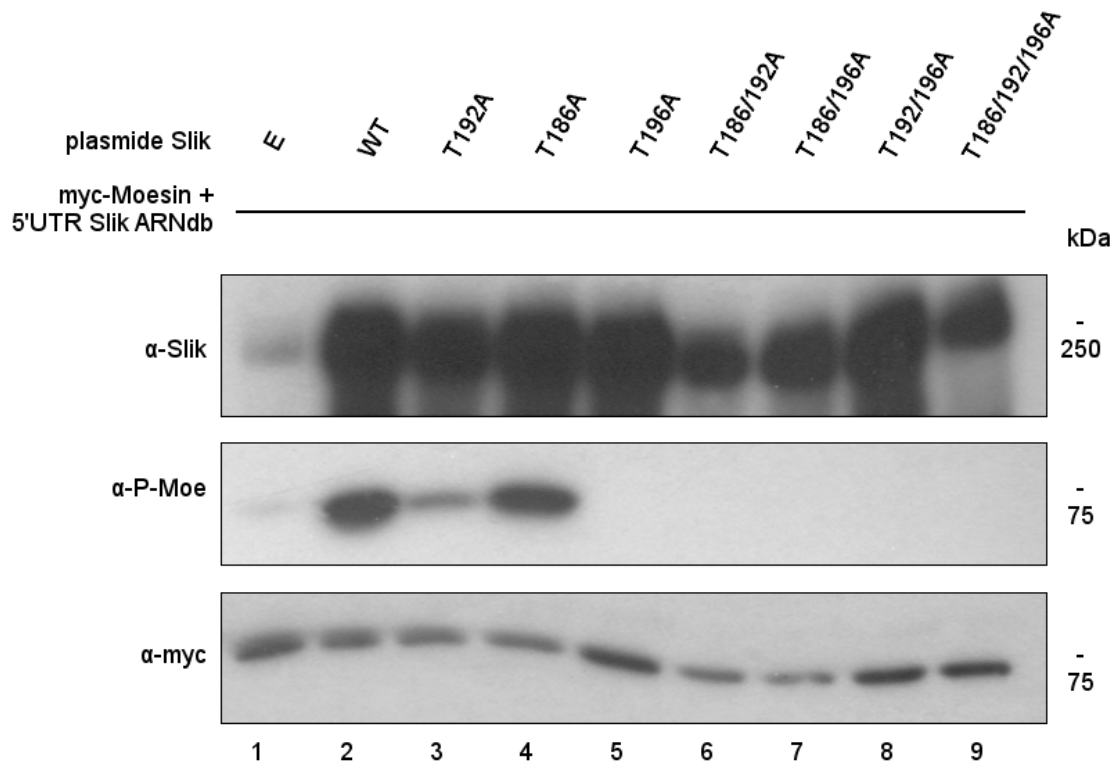
**Figure 11 - Identification des sites de phosphorylation de Slik par LC-MS/MS.** Diagramme de Slik et son orthologue mammalien SLK, les domaines kinase sont en jaune, les régions de liaison non-conservées en blanc et les queues C-terminales conservées en gris. 20 sites de phosphorylation ont été identifiés dans la base de donnée Phosphosite.org ( $n \geq 3$ ) pour SLK. 19 sites ont été identifiés par spectromètre de masse pour Slik à partir d'échantillons provenant soit de cellules S2-R+ (jaune) , de moitiés antérieures de larves de drosophile (bleu) ou dans les deux (vert).

### **3.2 Résidus impliqués dans l'activation de Slik.**

La carte des sites de phosphorylation de Slik nous permet d'émettre des hypothèses sur la probabilité que certains résidus soient impliqués dans sa régulation. Une concordance a été observée entre Slik et SLK pour le segment d'activation (Fig. 11). Chez les mammifères, une étude a observé une phosphorylation des résidus T<sup>183</sup> et S<sup>189</sup> de SLK (T<sup>186</sup> et T<sup>192</sup> chez Slik) dans une structure cristalline du domaine kinase (Pike, Rellos et al. 2008). Une autre étude a démontré qu'une mutation de ces résidus semble entraîner une réduction de l'activité catalytique de SLK *in vitro* (Luhovy, Jaber et al. 2012). Cette étude a aussi étudié le rôle de T<sup>193</sup> (T<sup>196</sup> chez Slik) et a constaté que sa mutation entraîne également une diminution de l'activité kinase de SLK. En se basant sur ces faits, nous avons analysé l'importance des résidus phosphorylables du segment d'activation de Slik *in vitro* et *in vivo*.

#### **3.2.1 T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> sont importants pour l'activité kinase de Slik.**

Pour vérifier si les sites correspondant aux résidus importants pour l'activation de SLK sont aussi requis pour Slik, nous avons exprimé des mutants de Slik dans des cellules S2 ayant été déplétées de la forme endogène de la kinase par ARNi. La phosphorylation du substrat de Slik (Moesin) a été utilisée en tant qu'indicateur du taux d'activité de la kinase dans les cellules. Une forme de Moesin portant un épitope myc a été cotransfectée avec les mutants de Slik. Puisque le taux d'efficacité de la transfection est de 10 à 20%, ceci est nécessaire pour pouvoir observer facilement la restauration de la phosphorylation. Toutes les cellules ayant reçu les mutants de Slik reçoivent aussi myc-Moesin. Puisque l'épitope réduit la mobilité électrophorétique de Moesin, cela fournit un signal séparé de la bande endogène de Moesin. Ainsi, la phosphorylation observée correspond à 100% des cellules exprimant Slik. Les résidus T<sup>186</sup> et T<sup>192</sup> semblent tous deux être importants pour l'activité catalytique de Slik. En effet, bien qu'un effet modéré soit observé pour la mutation T192A et que la mutation T186A ne produit pas de modification, la double mutation T186/T192A entraîne une forte réduction de la phosphorylation de Moesin (Fig. 12). De plus, la mutation T196A produit une disparition pratiquement totale de cette phosphorylation.

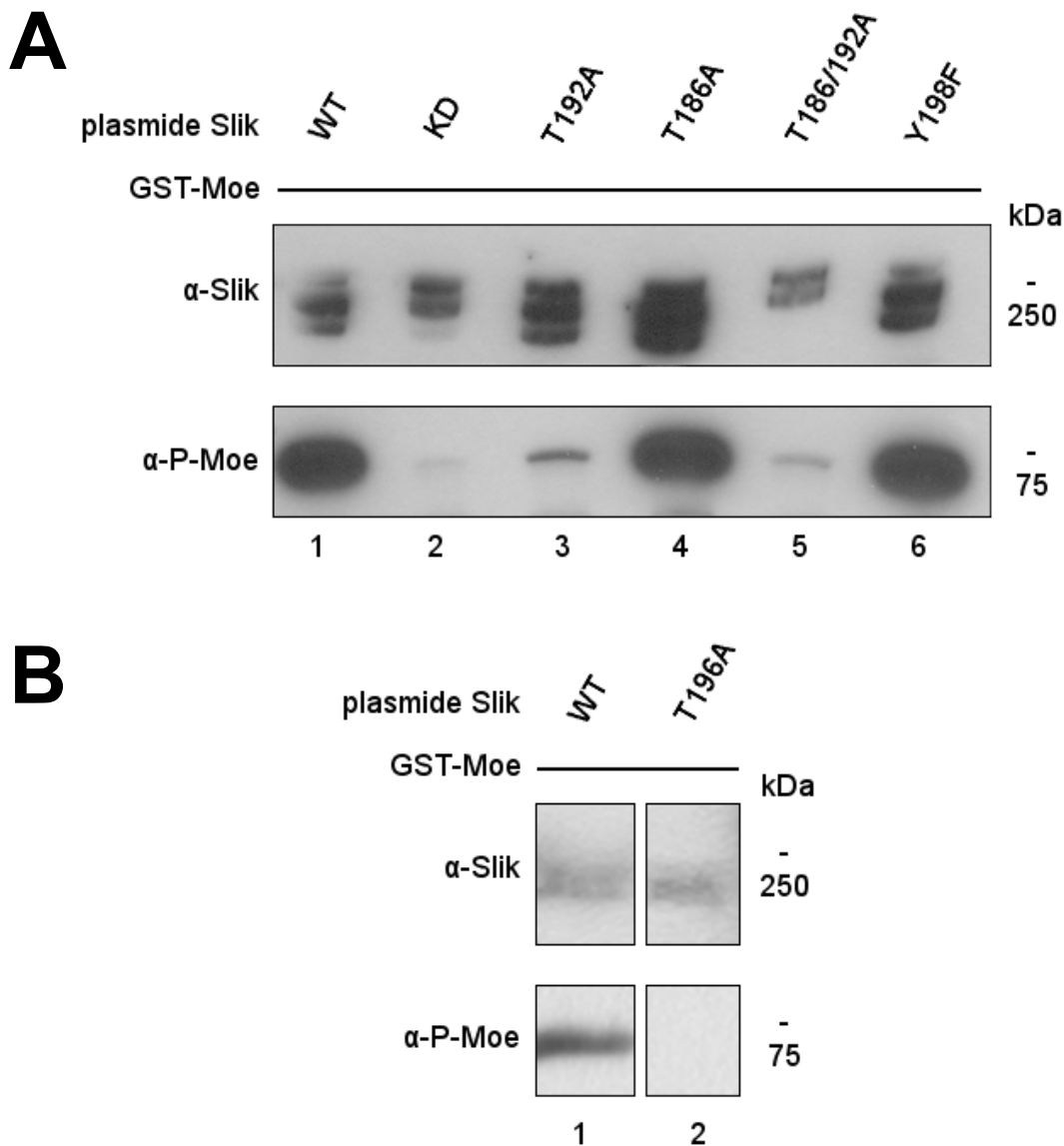


### Figure 12 - T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> sont importants pour l'activation de Slik

Immunobuvardage de type Western montrant l'effet des mutations de la boucle d'activation de Slik. La mesure de la phosphorylation de Moesin est possible grâce à un anticorps phosphospécifique, et elle sert à jauger le taux d'activation de Slik. Toutes les cellules ont été traitées avec de l'ARNdb Slik 5'UTR qui affecte uniquement la forme endogène de Slik. La colonne 1 (E) provient de cellules transfectées avec un vecteur vide (contrôle -). T<sup>196</sup> est critique pour l'activation de Slik, T<sup>186</sup> et T<sup>192</sup> sont partiellement redondants mais tous deux importants. Gel 6.5% acrylamide.

### 3.2.2 Les mutants de Slik agissent directement sur Moesin

Les mutants du segment d'activation de Slik ont aussi été testés dans un essai kinase *in vitro*. Une protéine de fusion GST-Moesin-CT a été produite dans des bactéries *E.coli* BL-21 et purifiée pour servir de substrat. Le domaine C-terminal a été utilisé car c'est à cet endroit que Slik phosphoryle Moesin. Les mutants de Slik ont été surexprimés dans des cellules S2 et purifiés par immunoprécipitation. La kinase et son substrat ont été incubés dans un tampon contenant les substances requises pour la phosphorylation pendant 30 minutes. Un immunobuvardage de type Western a ensuite permis de visualiser le niveau d'activité de la kinase à l'aide de l'anticorps phosphospécifique pour Moesin (Fig. 13). Les résultats sont comparables à ceux observés dans les échantillons provenant des cellules S2 (Fig.12). Nous avons aussi testé le mutant Y198F car ce résidu phosphorylable est conservé chez les orthologues de Slik, mais aucun effet notable a été observé par rapport à la forme sauvage de Slik (Fig. 13.A colonne 6).



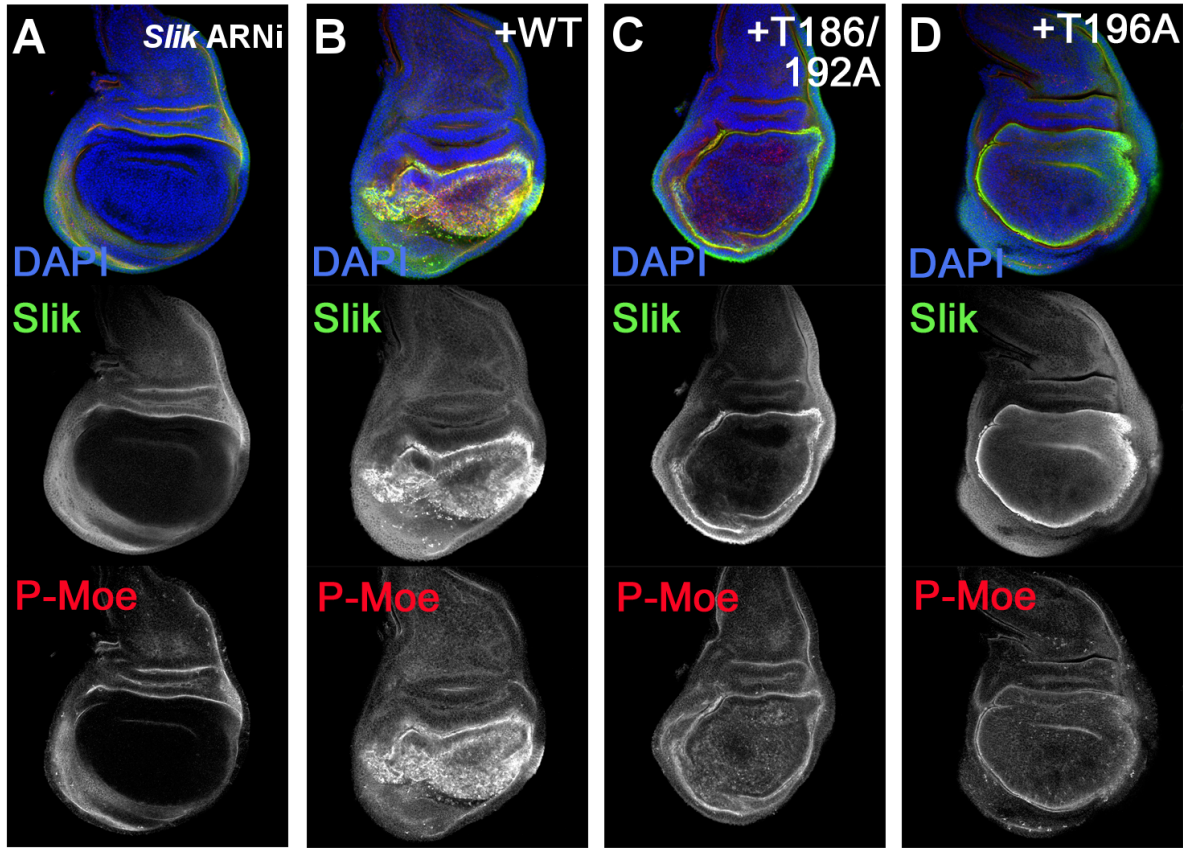
**Figure 13 - La phosphorylation de Moesin par Slik est directe.**

(A) Immunobuvardage de type Western montrant un essai kinase de Slik avec une protéine de fusion GST (GST-Moesin). Slik est immunoprécipitée et mise en incubation (45mins, 30°C) avec le substrat GST-Moe dans un tampon comprenant de l'ATP. La phosphorylation de GST-Moe est détectée à l'aide d'un anticorps phosphospécifique et indique l'activité de la kinase. Gel 7% acrylamide. (B) Expérience similaire avec le mutant Slik T196A et Slik<sup>WT</sup> à un niveau similaire d'expression pour comparaison.

### 3.2.3 T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> modulent l'activité kinase de Slik *in vivo*.

Afin de déterminer si les mutants du segment d'activation de Slik ont un effet dans un contexte physiologique, nous avons créé des lignées de drosophiles dans lesquelles les différentes formes de la kinase sont sous le contrôle d'un site *UAS*. La séquence des mutants de Slik a été insérée au même endroit du génome à l'aide de l'intégrase du bactériophage  $\Phi$ C31 pour assurer un taux d'expression constant (Bischof, Maeda et al. 2007).

Premièrement, la déplétion de la forme endogène de Slik a été effectuée en croisant une lignée *nub*-GAL4 au transgène *UAS*-ARNdb Slik 5'UTR. Ceci a réduit de façon efficace l'expression de Slik dans la poche de l'aile du disque imaginal par la méthode d'ARNi. Une réduction concomitante de la phosphorylation de Moesin peut être observée (Fig. 14.A). La restriction de l'expression de transgènes uniquement dans ce tissu assure la survie de l'organisme au moins durant les stades larvaires. La phosphorylation de Moesin peut être rétablie en co-exprimant l'ARNdb Slik 5'UTR avec le transgène Slik<sup>WT</sup>. Ceci induit une augmentation du taux de phosphorylation de Moesin largement supérieur à celui observé dans des disques de type sauvage car cette forme de Slik n'est pas affectée par l'ARNi (Fig. 14.B). L'expression du mutant Slik T186A/T192A rétablit le signal pour Slik dans un contexte d'ARNdb Slik 5'UTR, mais le rétablissement de la phosphorylation de Moesin est partiel (Fig. 14.C). Finalement, des disques exprimant le mutant Slik T196A n'ont qu'un faible rétablissement de la phosphorylation de son substrat (Fig. 14.D). Les trois résidus régulateurs de l'activité kinase de Slik identifiés *in vitro* et dans les cellules S2 semblent donc être également importants pour le contrôle de la kinase *in vivo*.



**Figure 14 - T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> sont impliqués dans la régulation de Slik *in vivo***  
 Images de microscopie confocale montrant des disques imaginaux de l'aile de la drosophile exprimant différents mutants de Slik. **(A)** La forme endogène de la kinase est déplétée par un ARNdb Slik 5'UTR sous l'influence de l'activateur *nub*-GAL4, ce qui produit une également une réduction efficace de la phosphorylation de Moesin. **(B)** Rétablissement de la phosphorylation de Moesin par l'expression du transgène Slik<sup>WT</sup> à l'aide de *nub*-GAL4 dans un disque exprimant l'ARNdb Slik 5'UTR. **(C)** Le mutant Slik<sup>T186/192A</sup> et Slik<sup>T196A</sup> **(D)** ont une activité catalytique fortement réduite.

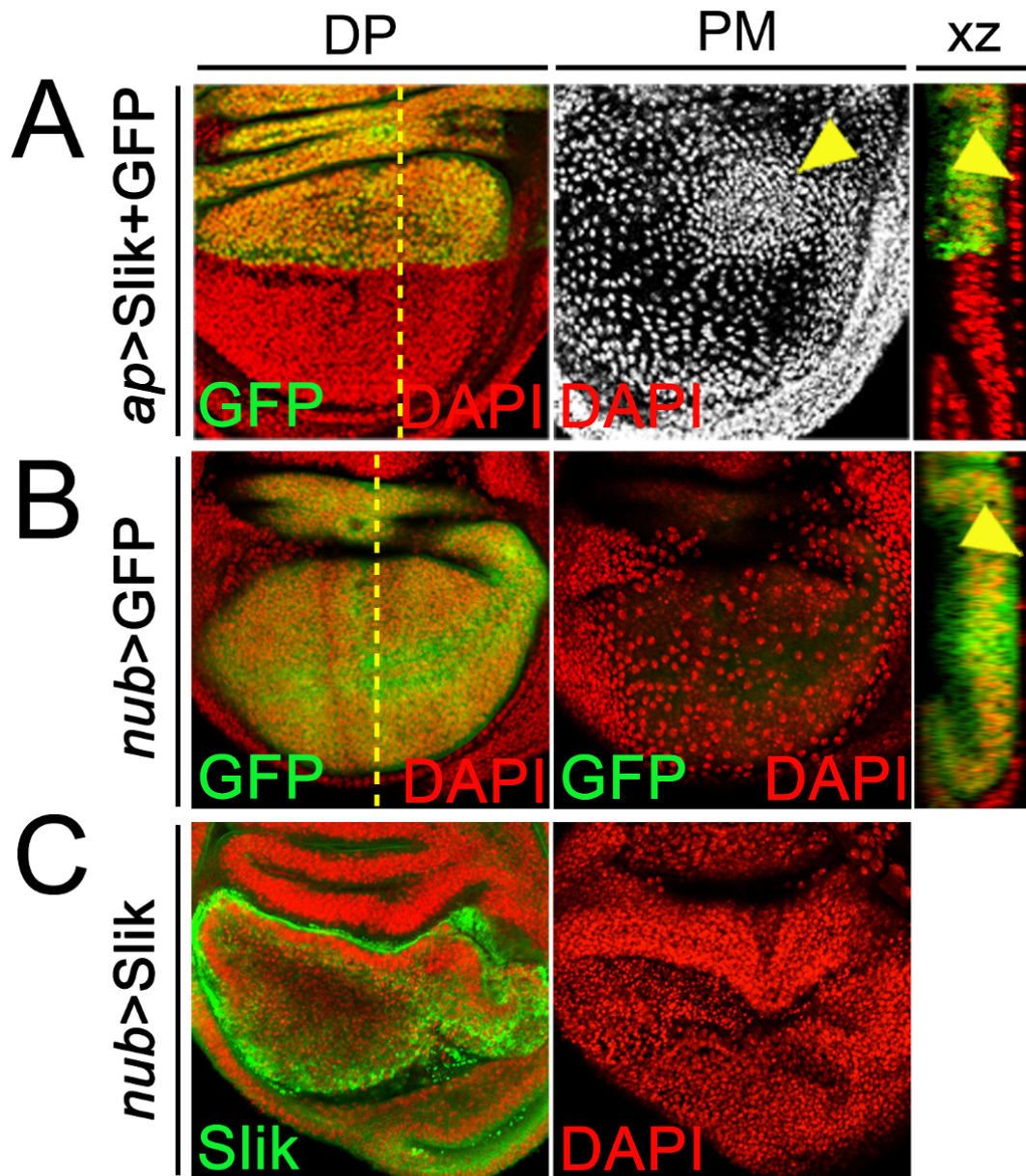
### **3.3 Mécanisme de régulation de la prolifération induite par Slik.**

Outre son rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale par la phosphorylation de Moesin, il a été démontré que Slik peut induire une prolifération cellulaire non-autonome, c'est-à-dire que les cellules qui sont proches de celles qui surexpriment Slik prolifèrent. Dans le modèle des disques imaginaires, la surexpression de Slik dans la couche DP induit la prolifération des cellules de la couche PM au-dessus (Fig. 5.B). Ce phénotype ne semble pas être dépendant de l'activité kinase de Slik car la surexpression de la forme catalytiquement inactive de la kinase (Slik<sup>KD</sup>) produit une prolifération similaire (Hipfner and Cohen 2003). Il est clair que ce mécanisme doit pouvoir être contrôlé car la croissance non régulée cause de nombreux problèmes dont le cancer (Hanahan and Weinberg 2000). Pour tenter d'élucider ce mécanisme, nous avons utilisé notre modèle *in vivo* et les mutants de Slik ayant un effet sur son activité catalytique. Bien que la prolifération non-autonome semble être indépendante de l'activité kinase de Slik, il se peut que les résidus importants pour la régulation de cette dernière le soit aussi pour la prolifération.

#### **3.3.1 La croissance induite par Slik ne dépend pas de l'activateur.**

Le système GAL4-UAS que nous utilisons *in vivo* est versatile car l'activateur couplé à GAL4 permet de cibler l'expression d'un transgène spécifiquement dans un tissu. Plusieurs d'entre-eux sont spécifiques au disque imaginal de l'aile. Afin de s'assurer que le phénotype de croissance non-autonome se produit peu importe l'activateur utilisé, nous avons induit la co-expression de Slik et de GFP chez des drosophiles. La protéine GFP permet de visualiser le tissu ciblé par l'activateur. Les activateurs utilisés dans ce cas (*nub* et *ap*) induisent l'expression uniquement dans la couche DP (Fig. 15.A/B en vert). La croissance est observée par une augmentation de la densité de cellules dont les noyaux sont colorés par DAPI. L'activateur *ap* induit une prolifération non-autonome dans la partie dorsale du disque (Fig. 15.A, flèches). L'expression de GFP par *nub* est ubiquitaire dans la poche de l'aile mais n'induit pas de croissance (Fig. 15.B). Tel qu'attendu, l'expression de Slik par *nub* induit une prolifération des cellules de la couche PM. Une invagination causée par une trop



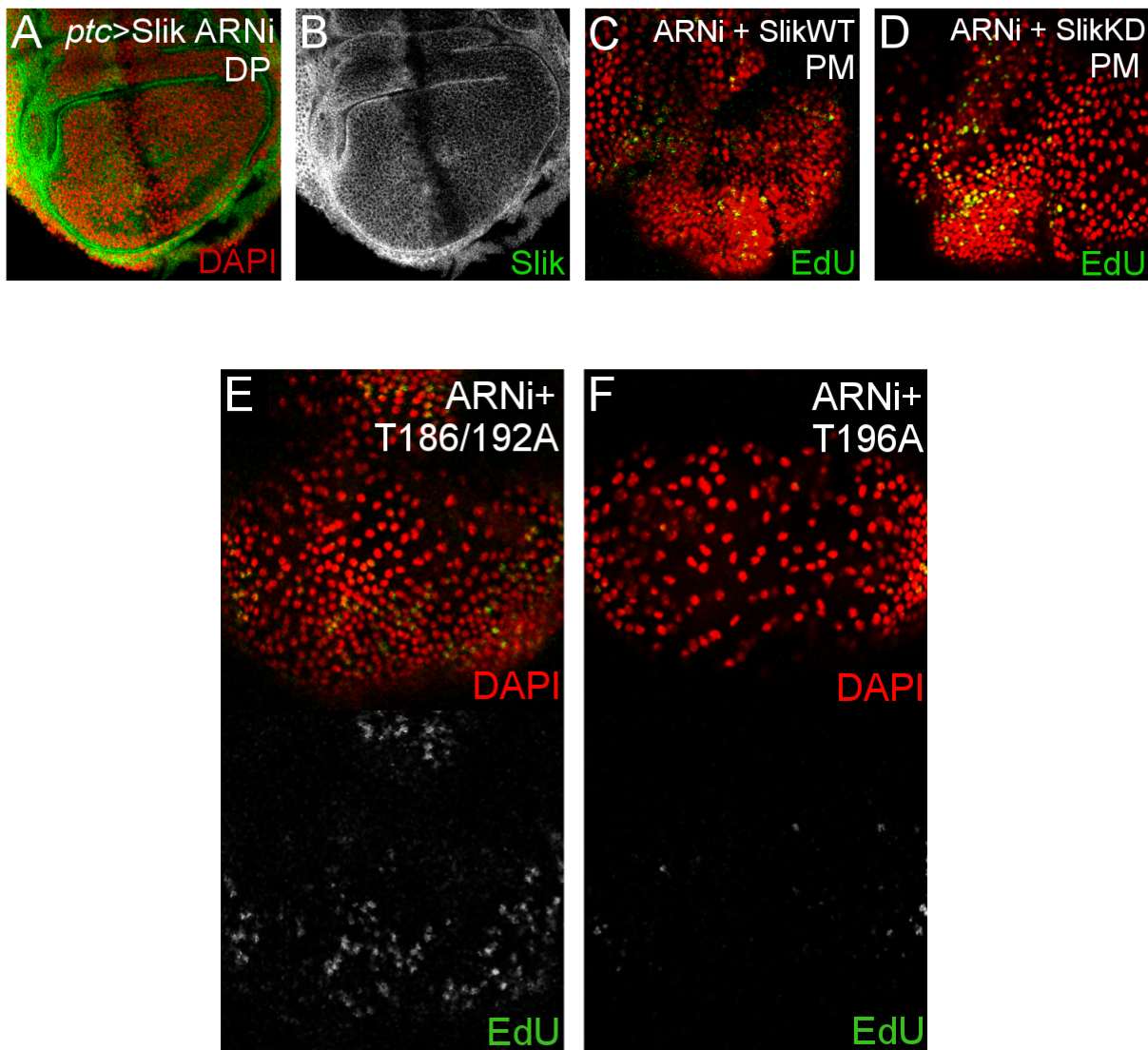


**Figure 15 - La croissance induite par Slik ne dépend pas de l'activateur utilisé**  
 Images de microscopie confocale montrant des disques imaginaux de l'aile exprimant soit GFP ou Slik. **(A)** Prolifération non-autonome induite par l'expression du transgène *UAS-Slik* sous le contrôle de *ap-GAL4* (PM, flèche). La coexpression de GFP permet de visualiser le tissu dans lequel l'expression se produit. **(B)** Tissu visé par l'activateur *nub-GAL4* visible par l'expression de GFP. Il n'y a pas de prolifération non-autonome car Slik n'est pas exprimée. **(C)** Prolifération non-autonome causée par l'expression de Slik qui est induite par *nub-GAL4*.

grande densité de cellules peut d'ailleurs être observée (Fig. 15.C). La prolifération ne dépend donc pas de l'activateur.

### **3.3.2 La phosphorylation du segment d'activation régule l'activité non-catalytique de Slik.**

La prolifération non-autonome induite par Slik ne semble pas être liée à son activité catalytique car la surexpression de Slik<sup>KD</sup> cause aussi ce phénotype. Toutefois, l'expérience qui a démontré ce processus a été faite dans des tissus exprimant également la forme sauvage de Slik. Il a été démontré que certaines kinases peuvent être activées par dimérisation (Delarosa, Guillemette et al. 2011). Afin de s'assurer que le phénotype que nous observons ne soit pas dû à l'activation de Slik<sup>KD</sup> par sa dimérisation avec la forme sauvage de Slik, nous avons déplété cette dernière à l'aide de l'ARNdb Slik 5'UTR exprimé par l'activateur *ptc*-GAL4. Ceci cause une réduction efficace de l'expression de Slik dans une ligne de la couche DP (Fig. 16.B). Tel qu'attendu, la coexpression de l'ARNdb Slik 5'UTR et du transgène Slik<sup>WT</sup> dans la couche DP cause une prolifération des cellules de la couche PM directement au-dessus (Fig. 16.C). La surexpression de Slik<sup>KD</sup> dans le tissu où la kinase endogène est déplétée induit également cette prolifération, ce qui est visible par l'augmentation de la densité cellulaire et l'incorporation d'EdU (Fig. 16.D). Le tissu avoisinant ne prolifère pas et peut être utilisé en tant que contrôle négatif. Ceci confirme que Slik possède bien une activité non-catalytique. Nous notons aussi que la surexpression de Slik<sup>WT</sup> ou Slik<sup>KD</sup> par *ptc* cause un haut taux de létalité. En effet, la plupart de ces drosophiles transgéniques meurent au stade de pupes. Par contraste, la surexpression des mutants Slik T186/192A et T196A est beaucoup mieux tolérée car la plupart des mouches arrivent au stade d'adulte. Au niveau des disques imaginaux du troisième stade larvaire, le mutant Slik T186/192A ne cause qu'un faible phénotype de prolifération non-autonome (Fig. 16.E). Quant à lui, le mutant Slik T196A ne cause pas de prolifération (Fig. 16.F). Ceci semble donc démontrer que la phosphorylation du segment d'activation est importante non seulement pour l'activité catalytique de Slik, mais aussi pour son rôle non-catalytique.



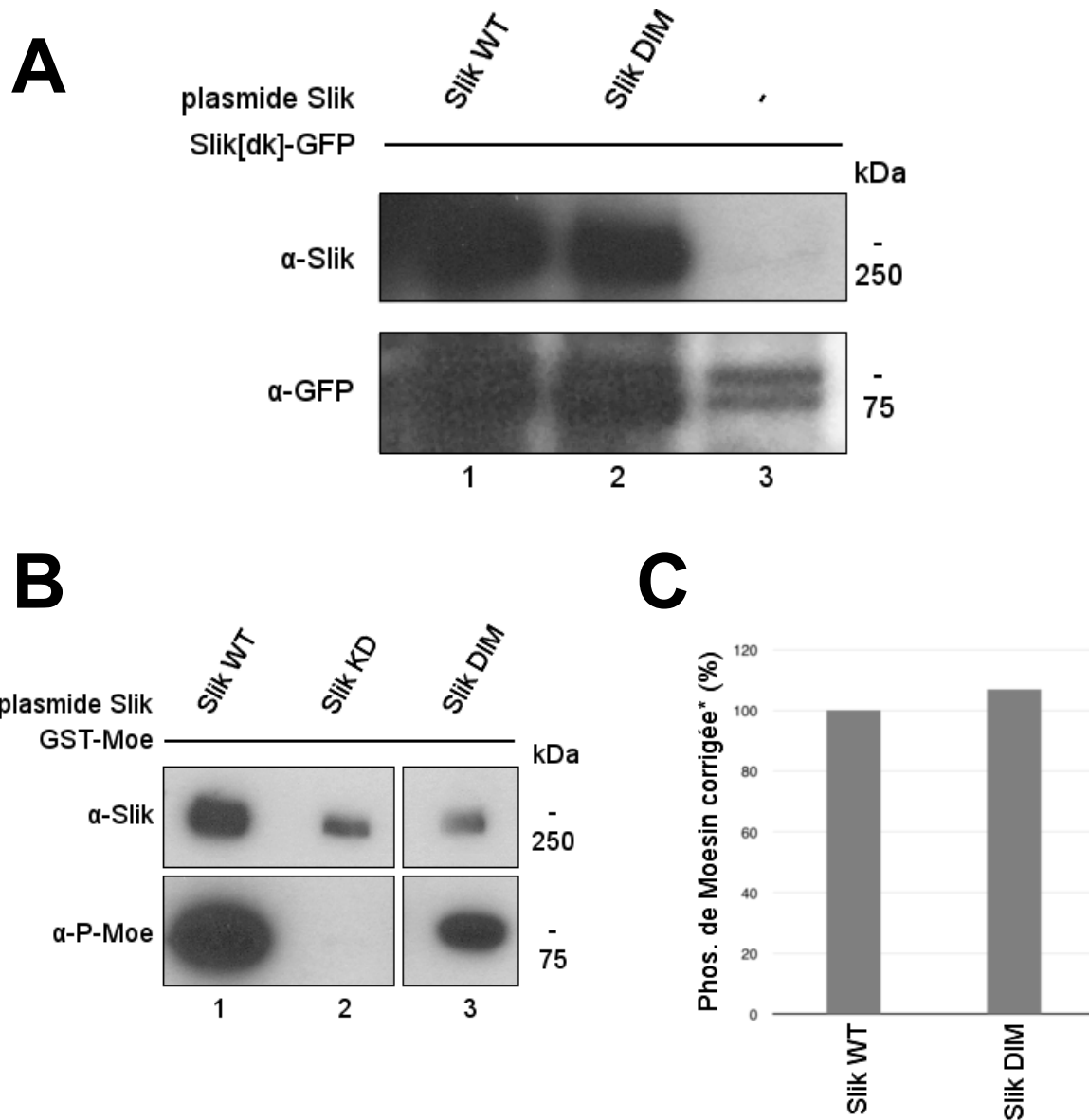
**Figure 16 - La phosphorylation du segment d'activation contrôle l'activité non-catalytique de Slik.**

(A) L'ARNdb Slik 5'UTR sous le contrôle de l'activateur *ptc*-GAL4 n'affecte pas les cellules et (B) induit une déplétion de la forme endogène de Slik dans une ligne de la couche DP. La réintroduction de Slik<sup>WT</sup> (C) ou Slik<sup>KD</sup> (D) à l'aide de *ptc*-GAL4 dans des disques qui sont déplétés en Slik endogène produit un phénotype de prolifération non-autonome dans les cellules de la couche PM au-dessus de la ligne d'expression de la couche DP. (E) La coexpression de l'ARNdb et du mutant Slik T186/192A par *ptc*GAL4 cause un faible phénotype de prolifération non-autonome. (F) La mutation T196A abolit la prolifération non-autonome induite par Slik.

### **3.4 La mutation Slik Q188P n'affecte pas la dimérisation de Slik.**

Mis à part la phosphorylation du segment d'activation, il a été démontré que des kinases peuvent être activées par dimérisation (Pike, Rellos et al. 2008, Delarosa, Guillemette et al. 2011). Une étude a suggéré que l'activation de SLK passe entre autres par une dimérisation qui dépend de la présence d'un résidu Gln conservé du le segment d'activation, soit Q185 chez SLK ou Q188 chez Slik (Luhovy, Jaber et al. 2012). L'importance de ce résidu pour la dimérisation a été inférée par l'observation de certaines kinases PAKs ayant une mutation à cet endroit. La présence d'une proline au lieu d'une glutamine rend ces kinases monomériques. La mutation Q185P chez SLK inhibe sa capacité à s'autophosphoryler, ce qui est significatif car la phosphorylation est cruciale pour son activation (Luhovy, Jaber et al. 2012).

Nous avons créé un mutant Slik Q188P (Slik<sup>DIM</sup>) pour tester son effet sur l'activité de la kinase chez la drosophile. De façon surprenante, Slik<sup>DIM</sup> peut dimériser avec Slik<sup>WT</sup> dans une expérience de co-immunoprécipitation (données non illustrées). Pour éliminer la possibilité d'une interaction des domaines C-terminaux qui a d'ailleurs été observée chez SLK (Cybulsky, Takano et al. 2009), nous avons répété une expérience similaire avec le domaine kinase de Slik (Slik[dk]-GFP). Slik<sup>WT</sup>-myc ou Slik<sup>DIM</sup>-myc sont co-exprimés dans des cellules S2 avec Slik[dk]-GFP. Nous avons utilisé un anticorps  $\alpha$ -myc lors de l'immunoprécipitation et  $\alpha$ -GFP pour l'immunobuvardage. La présence du signal GFP pour les deux formes de Slik signifie que le domaine kinase de Slik peut interagir avec Slik<sup>DIM</sup> aussi bien qu'avec Slik<sup>WT</sup> (Fig. 17.A). La colonne 3 est le contrôle montrant que l'expression de Slik[dk]-GFP seule n'est pas détectable par co-immunoprécipitation. La double bande observée est un signal non-spécifique. Nous avons aussi testé l'effet de la mutation Q188P sur l'activité catalytique de Slik *in vitro* (Fig. 17.B). Les différentes formes de Slik sont purifiées par immunoprécipitation à partir de cellules S2. Lorsqu'on corrige le niveau de phosphorylation de Moesin par rapport au niveau d'expression de Slik, on constate que le mutant Slik<sup>DIM</sup> possède une activité similaire à Slik<sup>WT</sup> (Fig. 17.C). Il semble donc que la mutation Q188P n'aie pas d'effet observable sur la dimérisation et l'activité de Slik.



**Figure 17 - Le mutant Slik<sup>DIM</sup> n'affecte pas l'activité et la dimérisation de Slik.**  
**(A)** Immunobuvardage de type Western montrant que le domaine kinase de Slik (Slik[dk]-GFP) peut être co-immunoprécipité par Slik<sup>WT</sup> mais aussi par le mutant de dimérisation Slik<sup>DIM</sup>. Gel 7% acrylamide. **(B)** Essai kinase *in vitro* montrant que l'activité catalytique de Slik<sup>DIM</sup> est comparable à celle de Slik<sup>WT</sup>. Ceci est observable en corrigeant pour le niveau d'expression de la kinase. Gel 6% acrylamide. **(C)** Quantification du niveau de phosphorylation de Moesin normalisé pour le niveau d'expression de Slik (\*). Le niveau 100% a été attribué arbitrairement à Slik<sup>WT</sup>. Données obtenues avec ImageJ.

## 4. DISCUSSION

La kinase Sterile-20 Slik fait partie de la sous-famille GCK-V et elle est impliquée dans des processus cruciaux au développement et au maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux de *Drosophila*. Chez les mammifères, il existe deux orthologues GCK-V (SLK et LOK) ainsi que trois ERMs (Ezrin, Radixin et Moesin). Ceci complique l'analyse des différentes fonctions de ces kinases, en grande partie à cause de phénomènes de redondance. La déplétion ou la surexpression de Slik est souvent létale chez la mouche. De plus, cette kinase possède seulement un substrat de la famille ERM : Moesin. Ceci illustre l'avantage d'utiliser la drosophile pour étudier la fonction et la régulation de Slik.

Des avancées récentes dans l'étude de la fonction des kinases amènent de plus en plus de preuves que ces protéines peuvent jouer des rôles indépendamment de leur activité catalytique (Rauch, Volinsky et al. 2011). Il a été démontré que Slik possède deux rôles, soit la phosphorylation de Moesin et l'induction de la prolifération non-autonome indépendamment de son activité kinase (Hipfner and Cohen 2003, Hipfner, Keller et al. 2004). La régulation des kinases Sterile-20 a fait l'objet de plusieurs études ce qui a permis de constater l'importance de la phosphorylation de certains résidus pour l'activation de ces protéines. Nous voulions savoir si la phosphorylation était le mécanisme de contrôle de Slik et si son activité non-catalytique pouvait être régulée. Nous avons démontré que la phosphorylation de certains résidus du segment d'activation de Slik permet d'activer toutes ses fonctions, probablement grâce à un changement de conformation.

### **4.1 Slik possède des motifs de phosphorylation conservés.**

Le segment d'activation a été caractérisé dans des structures cristallines de kinases (Nolen, Taylor et al. 2004). Notamment, PKA a été la première kinase à être cristallisée dans une conformation active, ce qui a permis de mieux comprendre le rôle des différents résidus de ce segment. En comparant cette structure à d'autres kinases en conformation inactive, il est devenu apparent que la phosphorylation du

segment d'activation permet de stabiliser le domaine kinase qui est normalement dynamique et désorganisé. Au début de ce projet, peu de données étaient disponibles pour les kinases GCK-V chez les mammifères (SLK, LOK) et aucune pour Slik. L'alignement de leurs segments d'activation montre clairement quatre résidus phosphorylables conservés. Notre analyse par spectrométrie de masse a permis de confirmer qu'au moins trois de ces quatre résidus sont phosphorylés *in vivo* (T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup>, T<sup>196</sup>). Chez la plupart des kinases Ste20, le résidu correspondant à la T<sup>192</sup> de Slik est le principal régulateur de l'activation (Delpire 2009). Celui-ci peut être autophosphorylé et/ou *trans*-phosphorylé (Fig. 8 en vert et en rouge respectivement). Les résidus correspondant à la T<sup>186</sup> et à la T<sup>196</sup> de Slik sont également d'une certaine importance chez d'autres kinases Ste20. Le résidu Y<sup>198</sup> est en partie conservé, mais notre analyse n'a pas indiqué de phosphorylation à cet endroit pour Slik. Mis à part le segment d'activation, un regroupement de résidus phosphorylés tout juste à l'extérieur du domaine kinase est conservé chez Slik et ses orthologues (S<sup>340</sup>, S<sup>342</sup>, S<sup>345</sup>, T<sup>354</sup> chez Slik). Nous ne nous sommes pas attardés sur cette région de la protéine, mais des données disponibles dans la littérature pour SLK suggèrent l'existence d'un mécanisme d'inhibition. En effet, deux de ces résidus conservés chez SLK (S<sup>347</sup>, S<sup>348</sup>) sont à la base d'une régulation négative causée par l'activité de la caséine kinase II en réponse à l'activité de v-Src (Chaar, O'Reilly et al. 2006). Ceci suggère qu'un mécanisme de *trans*-phosphorylation existe pour SLK, ce qui est probable car nous avons démontré la présence de ce mécanisme chez Slik.

## **4.2 L'auto- et la *trans*-phosphorylation servent à réguler Slik.**

Nous avons démontré que Slik peut s'autophosphoryler *in vitro* (Fig. 10.A) ce qui n'est pas surprenant car ceci a déjà été observé chez SLK (Luhovy, Jaber et al. 2012). De plus, l'autophosphorylation est très courante chez les kinases Ste20. Toutefois, plusieurs faits tendent à démontrer qu'un mécanisme de *trans*-phosphorylation doit également exister. La perte de groupements phosphates se traduit par une augmentation de la mobilité électrophorétique d'une protéine. Il était donc attendu qu'un traitement à la  $\lambda$ -phosphatase induise cette augmentation pour

Slik<sup>WT</sup> car ceci peut être expliqué par un phénomène d'autophosphorylation. Par contre, nous l'avons également observée dans un échantillon provenant de cellules S2 n'exprimant que la forme catalytiquement inactive de Slik (Slik<sup>KD</sup>), ce qui suggère la présence de *trans*-phosphorylation. De plus, le phénomène de prolifération non-autonome induit par Slik est présent dans des disques imaginaux qui expriment la forme catalytiquement inactive de la kinase. Nous avons démontré que la phosphorylation de certains résidus dont notamment T<sup>196</sup> est essentielle pour cette prolifération cellulaire. Or, puisque Slik<sup>KD</sup> ne peut pas s'autophosphoryler, une autre kinase doit être impliquée. La *trans*-phosphorylation a déjà été observée à plusieurs reprises chez les kinases Ste20. En fait, la coexistence des deux mécanismes de phosphorylation est retrouvée entre autres chez PAK1, Hippo et HPK1 (King, Gardiner et al. 2000, Arnold, Patzak et al. 2005, Boggiano, Vanderzalm et al. 2011). Un processus en deux étapes est plausible, c'est-à-dire que Slik requiert peut-être une *trans*-phosphorylation avant de pouvoir s'autophosphoryler ou vice-versa. Ceci pourrait être testé à l'aide de la spectrométrie de masse. Un échantillon qui contient uniquement Slik<sup>KD</sup> purifié à partir de cellules S2 pourrait être analysé. Puisque cette forme de la kinase ne peut pas s'autophosphoryler, tous les sites de phosphorylation identifiés feraient partie du mécanisme *trans*. Si aucun site est identifié, cela pourrait signaler que l'autophosphorylation est nécessaire à une *trans*-phosphorylation subséquente.

### **4.3 T<sup>186</sup>, T<sup>192</sup> et T<sup>196</sup> régulent l'activité catalytique de Slik.**

La conservation de résidus phosphorylables de la boucle d'activation entre Slik et ses orthologues et les données sur la régulation d'autres kinases Ste20 ont rendu très probable l'hypothèse que l'activité catalytique de Slik est régulée par phosphorylation. La conception d'expériences visant à élucider l'importance de ces résidus a été simple puisqu'il n'y a pas de redondance fonctionnelle pour Slik et Moesin chez la drosophile. Nous avons observé une bonne concordance des résultats entre les modèles *in vitro* et *in vivo*. Le site correspondant à la T<sup>192</sup> de Slik est souvent un régulateur principal des kinases Ste20, ce qui est mis en évidence par sa



conservation totale dans cette famille (Fig. 8). Le site correspondant à la T<sup>186</sup> de Slik est conservé dans certaines kinases où il semble jouer un rôle secondaire dans leur activation (Nolen, Taylor et al. 2004, Delpire 2009). Ceci correspond à nos observations car la mutation T192A affecte plus l'activité catalytique de Slik que T186A. Toutefois, la phosphorylation d'au moins un de ces résidus est nécessaire car le double mutant T186/192A possède une très faible activité catalytique. En se basant sur la littérature, il est probable que T<sup>186</sup> soit un site d'autophosphorylation. Ceci est peut-être le cas pour T<sup>192</sup> aussi, quoique certaines kinases Ste20 sont *trans*-phosphorylées à ce résidu (Fig. 8). La mutation Slik T196A abolit l'activité catalytique de Slik à elle seule. Ce site est conservé dans toutes les kinases Ste20, mais peu d'études s'y sont penchées. La mutation de ce site pour une alanine induit une réduction de l'activité catalytique chez Mst1, SPAK et SLK (Gagnon, England et al. 2006, Luhovy, Jaber et al. 2012). Une étude structurale a démontré que ce résidu est situé près de la boucle P+1 qui entre en contact avec le substrat, et qu'il entre en contact avec d'autres résidus conservés de la boucle catalytique de la kinase (Nolen, Taylor et al. 2004). Ceci signifie que le résidu correspondant à la T<sup>196</sup> de Slik peut influencer non seulement l'interaction avec le substrat, mais aussi la conformation de la kinase.

D'autres résidus pourraient potentiellement affecter l'activité catalytique de Slik, comme par exemple le regroupement mentionné ci-haut composé de résidus Ser et Thr phosphorylés tout juste à l'extérieur du domaine kinase. Chez SLK, ceux-ci régulent négativement l'activité kinase lorsqu'ils sont phosphorylés. Nous pourrions donc nous attendre à observer une augmentation de la phosphorylation de Moesin en remplaçant ces résidus par des Ala chez Slik. Toutefois, ceci devrait être fait dans un contexte où cette augmentation peut être observée, c'est-à-dire que la saturation de la phosphorylation de Moesin ne doit pas être atteinte. Pour se faire, nous pourrions soit réduire le taux d'expression de Slik ou s'assurer qu'il y ait un excès de Moesin. Ceci fournirait une meilleure compréhension du mécanisme de contrôle de Slik qui se produit probablement en plusieurs étapes.

#### **4.4 L'activité non-catalytique de Slik peut être contrôlée par la phosphorylation du segment d'activation.**

Nous avons confirmé que le deuxième rôle de Slik dans l'activation de la prolifération non-autonome ne dépend pas de son activité kinase. En effet, des disques imaginaux qui expriment Slik<sup>KD</sup> dans un contexte où la forme endogène de la kinase est déplétée présentent ce phénotype. La régulation de cette prolifération est essentielle au bon développement de l'organisme. La phosphorylation a été proposée comme mécanisme de contrôle de l'activité non-catalytique chez certaines kinases. Par exemple, elle est requise pour que les ERKs activent topo-IIa et Parp1 (Shapiro, Whalen et al. 1999, Cohen-Armon, Visochek et al. 2007). De plus, un changement de signalisation kinase-indépendante vers kinase-dépendante peut être induit par la phosphorylation de Kss1 chez la levure (Madhani, Styles et al. 1997). Chez Slik, il est apparent que la phosphorylation du segment d'activation contrôle non seulement l'activité kinase, mais aussi l'activité non-catalytique. En effet, la mutation Slik T196A abolit complètement la prolifération non-autonome dans les disques imaginaux déplétés en Slik endogène. Aussi, la phosphorylation d'au moins T<sup>186</sup> ou T<sup>192</sup> semble être requise car le double mutant Slik T186/192A n'induit qu'une faible prolifération cellulaire.

La façon dont Slik induit la prolifération cellulaire non-autonome est encore inconnue. Puisque nos mutants du segment d'activation semblent pouvoir contrôler ce phénotype, il est possible qu'un changement de conformation soit en cause. En effet, le domaine kinase de certaines protéines telles que PKA est désorganisé lorsque le segment d'activation n'est pas phosphorylé. La phosphorylation stabilise le domaine kinase et lui permet de jouer son rôle catalytique, mais il est possible que cela permette également à la protéine d'interagir avec d'autres partenaires. Elle pourrait par exemple jouer un rôle de protéine de soutien, permettant ainsi l'induction d'un processus indépendamment de son activité kinase. Une étude a soumis l'hypothèse que la prolifération causée par Slik passe par Merlin, une composante de la voie de signalisation Hippo (Hughes and Fehon 2006). Normalement, Merlin inhibe la prolifération et cet effet peut être contrecarré en phosphorylant cette protéine. Nos

résultats démontrent que la forme catalytiquement inactive de Slik (Slik<sup>KD</sup>) cause une prolifération non-autonome similaire à celle causée par Slik<sup>WT</sup> (Fig. 16). Ceci tend à exclure la phosphorylation comme mécanisme de contrôle. L'inhibition de Merlin cause une croissance autonome mais ne cause pas de prolifération non-autonome (Hipfner *et al.*, données non publiées).

#### **4.5 Le mutant Slik Q188P ne présente aucun défaut fonctionnel.**

La dimérisation est un mécanisme bien connu dans le processus d'activation d'une kinase (Pike, Rellos et al. 2008). D'ailleurs, il a été démontré que ce mécanisme est impliqué dans l'activation de SLK (Delarosa, Guillemette et al. 2011). Nous avons démontré que Slik peut se dimériser à l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation (données non illustrées). Afin de déterminer si ce processus est important pour l'activation de Slik, nous nous sommes basés sur une étude qui suggérait qu'une mutation d'un résidu spécifique chez SLK (Q<sup>188</sup> chez Slik) induit un défaut de dimérisation (Luhovy, Jaber et al. 2012). Après avoir introduit ce mutant (Slik<sup>DIM</sup>) dans des cellules S2, nous avons effectué une expérience de co-immunoprécipitation qui a démontré qu'il peut se dimériser avec Slik<sup>WT</sup> (données non illustrées). La mutation Q188P se situe dans le domaine kinase N-terminal de Slik. Puisqu'il est possible que cette dimérisation ait lieu par une interaction du domaine C-terminal, nous avons répété cette expérience en utilisant uniquement le domaine kinase de Slik au lieu de Slik<sup>WT</sup> (Fig. 17.A). Ceci a démontré que Slik<sup>DIM</sup> peut également dimériser avec le domaine kinase de Slik. Pour s'assurer de l'absence d'effet de la mutation Slik Q188P, nous avons également testé ce mutant dans un essai kinase *in vitro* (Fig. 17.B). Nous n'avons pas observé de différence significative d'activité catalytique entre Slik<sup>WT</sup> et Slik<sup>DIM</sup> ce qui nous a forcé à conclure que le mutant ne présente aucun défaut fonctionnel. Cela ne signifie toutefois pas nécessairement que la dimérisation n'est pas requise pour l'activation de Slik. Il se peut aussi que cette mutation ait un effet chez SLK mais pas chez Slik.

## **4.6 Limite des approches expérimentales**

L'effet de Slik sur la prolifération non-autonome a été observé dans des tissus où la kinase était surexprimée. Ceci augmente généralement le contraste entre les phénotypes de type sauvage et ceux des mutants. Par contre, il se peut que l'effet observé ne corresponde pas exactement à la réalité dans un contexte physiologique. Toutefois, certains faits tendent à confirmer que Slik joue bel et bien un rôle dans la prolifération. Par exemple, des drosophiles mutantes (Slik<sup>-/-</sup>) ont un taux de croissance plus lent par rapport à celles de type sauvage. Ceci est également observé lorsqu'on induit l'expression d'une forme phosphomimétique de Moesin, ce qui enlève la possibilité que la réduction de la prolifération due à l'absence de Slik soit causée par des défauts de l'intégrité des tissus épithéliaux (Hipfner, Keller et al. 2004). D'autres expériences seront requises pour confirmer l'implication de Slik dans la prolifération non-autonome, mais jusqu'ici tous les faits pointent dans cette direction.

La réduction de l'expression de Slik par ARNi a été utilisée à multiples reprises dans ce projet puisque c'est une technique simple et efficace permettant d'étudier l'effet de certaines mutations chez la kinase. Toutefois, cette méthode ne permet généralement pas d'obtenir une déplétion totale de la forme endogène de Slik. Malgré que la réduction obtenue soit assez importante pour pouvoir observer l'impact des mutations effectuées sur Slik, il se peut que le niveau résiduel de Slik endogène fausse les résultats. Par exemple, une petite quantité de la kinase endogène pourrait activer une partie des mutants de Slik par un processus de dimérisation. Pour résoudre ce problème dans un contexte *in vivo*, une technique nommée «*Mosaic analysis with a repressible cell marker*» (MARCM) pourrait être utilisée. Ce processus se sert de la méthode de recombinaison FLP-FRT ainsi que du système GAL4-UAS pour générer une mosaïque où une drosophile aura certaines cellules exprimant un mutant tandis que d'autres exprimeront la protéine de type sauvage (Lee and Luo 2001). En utilisant une lignée Slik<sup>-/-</sup> comme point de départ pour la méthode MARCM, il sera alors possible d'avoir une mouche exprimant un mutant de Slik dans certaines cellules en l'absence totale de la kinase endogène.

En conclusion, ce mémoire fournit un exemple relativement rare d'une kinase ayant un rôle catalytique et non-catalytique tous deux contrôlés par la phosphorylation du segment d'activation. L'existence d'un mécanisme de *trans*-phosphorylation indique la présence d'effecteurs en amont de Slik qui pourront être étudiés. Slik est cruciale au maintien de l'intégrité épithéliale et à la croissance de l'organisme. La dérégulation de ces deux rôles peut mener au développement de maladies telles que le cancer. Il est donc important de connaître les paramètres qui influencent cette protéine.

## 5. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 5.1 Matériel génétique.

Pour créer les mutants de Slik, des sites de restriction *KpnI* et *NarI* ont été introduits silencieusement aux codons 195 et 200 de la séquence codante de Slik. Pour Slik T186A, Slik T192A et Slik T186/192A, un segment de Slik mesurant 700pb a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques pour introduire les mutations. Il a ensuite été lié dans un vecteur pBS au reste de la séquence de Slik à l'aide de *EcoRI/NarI* puis vérifié par séquençage. Pour tous les autres mutants, une digestion *EcoRI/NarI* a été utilisée car le site *KpnI* est détruit lors de l'introduction des ces mutations. Le mutant catalytiquement inactif Slik<sup>KD</sup> est le même que celui décrit précédemment (Hipfner and Cohen 2003). Après avoir vérifié leur intégrité, les mutants ont tous été transférés par les mêmes enzymes dans un vecteur d'expression *pMT.puro3c* qui introduit un épitope myc en N-terminal.

La séquence de Moesin a été placée dans des vecteurs *pMT.puro3c* qui contiennent soit un épitope myc en N-terminal ou GFP en C-terminal par une digestion *EcoRI/KpnI*. Les mutants Moesin T558A et T558D ont été générés par mutagenèse dirigée avec un PCR, puis ils ont été transférés avec les mêmes enzymes dans le vecteur d'expression *pMT.puro3c*.

L'ARNdb Slik 5'UTR a été synthétisé *in vitro* avec un fragment de la séquence endogène de Slik mesurant 390pb. Les brins d'ARN ont été créés à l'aide des kits T3 et T7 MEGAscript® (Ambion). Ils ont ensuite été appariés par une incubation à 95°C pendant 5 minutes.

Tous les mutants devant être exprimés chez *Drosophila* ont été transférés dans le vecteur *pUAST.attB*.

### 5.2 Culture cellulaire et transfection

Les expériences qui nécessitent un modèle de culture cellulaire ont été faites dans des cellules S2-R+ de drosophile. Celles-ci ont été mises en culture dans le milieu Schneider's (Lonza) complété avec 10% FBS (Gibco) et 50U/mL penstrep (Gibco).

Les cellules ont été incubées à 25°C et ont été mises en culture à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules / mL. Pour la technique d'ARNs interférents, l'ARNdb approprié a été ajouté au médium de culture au jour 0 à une concentration de 1µg/mL suivi d'une incubation de 48h. Au jour 2, les plasmides ont été transfectés à l'aide du réactif XtremeGENE HP® (Roche) selon la méthode décrite par le fabricant. Typiquement, 500ng/mL de plasmides Slik et 200ng/mL de plasmides Moesin ont été utilisés. Au jour 3, une deuxième dose égale d'ARNdb a été ajoutée avec 0.5mM de CuSO<sub>4</sub> pour l'induction. Les cellules ont finalement été recueillies pour une expérience au jour 5.

### **5.3 Anticorps, immunoprécipitation et SDS-PAGE**

Les anticorps ont été utilisés aux dilutions suivantes : anti-Slik de cochon d'Inde (Hipfner and Cohen 2003) à 1:250 pour l'immunocoloration et 1:20 000 pour l'immunobuvardage, sauf si spécifié autrement. Anticorps phosphospécifique Anti-Moesin-P<sup>T558</sup> de lapin (Cell Signaling Technologies) à 1:100 pour l'immunocoloration et 1:2000 pour l'immunobuvardage. Anti-c-myc de souris (Santa Cruz) à 1:2000. Anti-GFP de lapin (Torrey Pines Biolabs Inc.) à 1:1000.

Pour l'immunoprécipitation, les cellules ont été récoltées dans du PBS froid et lysées pendant 15 minutes à 4°C dans un tampon de lyse [50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40 avec 1x d'inhibiteur de protéase (Roche), 1X AEBSF (Sigma) et 1x d'inhibiteur de phosphatase (Roche)]. Après une centrifugation pour éliminer les débris cellulaires (12 000g, 15mins, 4°C), le lysat a été incubé avec l'anticorps approprié pendant 1h à 4°C puis avec des billes d'agarose A/G (Santa Cruz) pendant 1h à 4°C. Les billes ont été lavées dans le tampon de lyse 3 fois pendant 5 minutes puis suspendues dans du tampon Laemmli 2x à 80°C pendant 5 minutes pour décoller et dénaturer les protéines d'intérêt.

Les protéines ont été séparées à l'aide d'une électrophorèse standard de type SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*). Elles ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF par une méthode semi-sèche (1h, 15V). La membrane a finalement été bloquée avec une solution de BSA 1% ou de protéine de lait 5% et immunobuvardée selon un protocole standard. L'analyse d'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ v1.48.

## **5.4 Essais kinase *in vitro***

La protéine de fusion GST-Moesin utilisée dans les essais kinase a été produite par des bactéries BL21. Le plasmide codant pour cette protéine est transformé dans ces bactéries. Celles-ci sont ensuite incubées durant 12h à 37°C puis la production de la protéine est induite par l'ajout de 100 µM d'IPTG dans le milieu de culture (LB amp). Après 2h, les bactéries sont lysées par sonication dans un tampon PBS 1% Triton et le lysat est incubé avec des billes GST pendant 30 minutes à 4°C. Les billes sont ensuite lavées avec un tampon PBS 0.1% Triton trois fois et la protéine de fusion est finalement éluée par l'ajout d'un tampon 50mM Tris pH 8.0, 10mM glutathione. La quantité de protéine obtenue peut être évaluée par comparaison avec un standard de BSA dans un gel coloré par Coomassie.

Pour l'essai kinase, Slik est immunoprécipitée selon le protocole décrit ci-haut, puis elle est incubée avec 2µg de la protéine de fusion GST-Moesin dans un tampon de réaction (20mM Tris pH 7.5, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 1mM NaVO<sub>4</sub>, 10mM β-glycérophosphate, 0.1mg/mL AEBSF, 50µM ATP) pendant 1h à 30°C dans un volume de 20µL. Le tampon Laemmli est ajouté et les protéines sont finalement séparées par SDS-PAGE pour l'immunobuvardage.

## **5.5 Métissage et génotypes des drosophiles**

Toutes les mouches font partie de la lignée BL9750. Tous les transgènes de Slik qui ont été injectés étaient dans un plasmide *pUAST.attB* qui a été intégré au locus 65B2 à l'aide de l'intégrase de PhiC31 (Bischof, Maeda et al. 2007). Les drosophiles ayant une insertion d'ARNdb Slik 5'UTR dans le chromosome 2 ou 3 ont été générées par la méthode de transgénèse utilisant les éléments P.

Génotypes :

Fig. 14.A : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr ; nub GAL4/+*

Fig. 14.B : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr ; UAS-Slik<sup>WT</sup> / nub GAL4*

Fig. 14.C : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr ; UAS-Slik<sup>T186/192A</sup> / nub GAL4*

Fig. 14.D : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr ; UAS-Slik<sup>T196A</sup> / nub GAL4*



Fig 15.A : *UAS-GFP/+* ; *UAS-Slik<sup>WT</sup>/ ap GAL4*

Fig 15.B : *UAS-GFP/+* ; *nub GAL4 / +*

Fig 15.C : *UAS-Slik<sup>WT</sup>/ nub GAL4*

Fig 16.A/B : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr* ; *ptc GAL4/+*

Fig 16.C : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr* ; *UAS-Slik<sup>WT</sup>/ ptc GAL4*

Fig 16.D : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr* ; *UAS-Slik<sup>KD</sup>/ ptc GAL4*

Fig 16.E : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr* ; *UAS-Slik<sup>T186/192A</sup>/ ptc GAL4*

Fig 16.F : *UAS-ARNdb Slik 5'UTR/UAS-Dcr* ; *UAS-Slik<sup>T196A</sup>/ ptc GAL4*

## **5.6 Immunocoloration, étiquetage par EdU**

La moitié antérieure de larves de drosophiles du troisième stade a été dissectée dans du PBS pour éliminer le gras, le système digestif et les glandes salivaires ainsi que d'autres structures. Ceci permet d'isoler les disques imaginaux de l'aile. Les carcasses résultantes ont été transférées dans du PBS froid puis elles ont été fixées par l'ajout de 4% PFA dans 0.2% PBT (PBS + 0.2% Tween) pour 20 minutes. Les carcasses ont ensuite été lavées 3 fois dans du 0.2% PBT puis bloquées pendant 1h dans du BBT (0.2% PBT + 0.3% BSA). L'anticorps primaire a ensuite été dilué dans du 0.2% PBT pour l'incubation de 12h avec les carcasses. Après 3 lavages dans du 0.2% PBT, elles sont ensuite incubées pendant 2h avec un anticorps secondaire fluorescent (Invitrogen, Jackson). En prenant soin de protéger les carcasses de la lumière, 3 autres lavages ont été faits suivi d'une incubation avec le colorant DAPI 1:2000 pendant 10 minutes. Un dernier lavage a été fait, puis les carcasses ont été suspendues dans le milieu de microscopie (90g glycérol, 10mL PBT, 2.1g n-propyl gallate).

Pour la coloration EdU, les moitiés antérieures de larves ont été dissectées dans du milieu sans sérum (EX-CELL 420, Sigma) puis elles ont été incubées avec l'EdU 10mM dans le même médium (1:1000) pour 1h. Les carcasses ont ensuite été fixées tel que décrit ci-haut puis elles ont été lavées 2 fois dans du BSA 3%. Le cocktail de détection d'Invitrogen (Click-IT EdU, Invitrogen) a ensuite été ajouté selon les

directives du fabricant. Une coloration DAPI a été faite tel que décrit ci-haut et les carcasses ont finalement été suspendues dans le milieu de microscopie.

Toutes les images *in vivo* ont été acquises par un microscope confocal LSM 700 (Zeiss).

## **5.7 Spectrométrie de masse**

Les échantillons devant être analysés par le spectromètre de masse proviennent soit de cellules S2-R+ ou de moitiés antérieures de larves de drosophiles du troisième stade. Slik a été concentrée et purifiée par une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps  $\alpha$ -Slik par la méthode décrite ci-haut. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par une électrophorèse dans un gel gradient 4-15% de polyacrylamide (BioRad). Une coloration au bleu colloïdal (Life Technologies, voir les directives du fabricant) a permis de visualiser les bandes. Celle correspondant à la taille de Slik a été découpée dans une chambre blanche, puis elle a été envoyée au plateau de spectrométrie de masse. La technique de préparation et d'analyse de l'échantillon est la même que décrite précédemment (Maier, Cheng et al. 2014).

## 6. Bibliographie

- Arnold, R., I. M. Patzak, B. Neuhaus, S. Vancauwenbergh, A. Veillette, J. Van Lint and F. Kiefer (2005). "Activation of hematopoietic progenitor kinase 1 involves relocation, autophosphorylation, and transphosphorylation by protein kinase D1." Mol Cell Biol 25(6): 2364-2383.
- Ashburner, M., Golic, K.G., Hawley, R.S. (2005). Drosophila : a laboratory handbook. Second edition.
- Atkins, M. and G. Mardon (2009). "Signaling in the third dimension: the peripodial epithelium in eye disc development." Dev Dyn 238(9): 2139-2148.
- Beckingham, K. M., J. D. Armstrong, M. J. Texada, R. Munjaal and D. A. Baker (2005). "Drosophila melanogaster--the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms." Gravit Space Biol Bull 18(2): 17-29.
- Benner, G. E., P. B. Dennis and R. A. Masaracchia (1995). "Activation of an S6/H4 kinase (PAK 65) from human placenta by intramolecular and intermolecular autophosphorylation." J Biol Chem 270(36): 21121-21128.
- Bilder, D., M. Li and N. Perrimon (2000). "Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors." Science 289(5476): 113-116.
- Bischof, J., R. K. Maeda, M. Hediger, F. Karch and K. Basler (2007). "An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases." Proc Natl Acad Sci U S A 104(9): 3312-3317.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature 411(6835): 355-365.
- Boggiano, J. C., P. J. Vanderzalm and R. G. Fehon (2011). "Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway." Dev Cell 21(5): 888-895.
- Bokoch, G. M. (2003). "Biology of the p21-activated kinases." Annu Rev Biochem 72: 743-781.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development 118(2): 401-415.
- Carreno, S., I. Kouranti, E. S. Glusman, M. T. Fuller, A. Echard and F. Payre (2008). "Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells." J Cell Biol 180(4): 739-746.

- Casaleto, J. B., I. Saotome, M. Curto and A. I. McClatchey (2011). "Ezrin-mediated apical integrity is required for intestinal homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A 108(29): 11924-11929.
- Chaar, Z., P. O'Reilly, I. Gelman and L. A. Sabourin (2006). "v-Src-dependent down-regulation of the Ste20-like kinase SLK by casein kinase II." J Biol Chem 281(38): 28193-28199.
- Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." Science 331(6024): 1559-1564.
- Clucas, J. and F. Valderrama (2014). "ERM proteins in cancer progression." J Cell Sci 127(Pt 2): 267-275.
- Cohen-Armon, M., L. Visochek, D. Rozensal, A. Kalal, I. Geistrikh, R. Klein, S. Bendetz-Nezer, Z. Yao and R. Seger (2007). "DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation." Mol Cell 25(2): 297-308.
- Cybulsky, A. V., T. Takano, J. Guillemette, J. Papillon, R. A. Volpini and J. A. Di Battista (2009). "The Ste20-like kinase SLK promotes p53 transactivation and apoptosis." Am J Physiol Renal Physiol 297(4): F971-980.
- Dan, I., N. M. Watanabe and A. Kusumi (2001). "The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades." Trends Cell Biol 11(5): 220-230.
- Delarosa, S., J. Guillemette, J. Papillon, Y. S. Han, A. S. Kristof and A. V. Cybulsky (2011). "Activity of the Ste20-like kinase, SLK, is enhanced by homodimerization." Am J Physiol Renal Physiol 301(3): F554-564.
- Delpire, E. (2009). "The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases." Pflugers Arch 458(5): 953-967.
- Dhanasekaran, N. and E. Premkumar Reddy (1998). "Signaling by dual specificity kinases." Oncogene 17(11 Reviews): 1447-1455.
- Endo, J., N. Toyama-Sorimachi, C. Taya, S. Kuramochi-Miyagawa, K. Nagata, K. Kuida, T. Takashi, H. Yonekawa, Y. Yoshizawa, N. Miyasaka and H. Karasuyama (2000). "Deficiency of a STE20/PAK family kinase LOK leads to the acceleration of LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes." FEBS Lett 468(2-3): 234-238.
- Fehon, R. G., A. I. McClatchey and A. Bretscher (2010). "Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins." Nat Rev Mol Cell Biol 11(4): 276-287.
- Fievet, B., D. Louvard and M. Arpin (2007). "ERM proteins in epithelial cell organization and functions." Biochim Biophys Acta 1773(5): 653-660.

- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature 391(6669): 806-811.
- Gagnon, K. B., R. England and E. Delpire (2006). "Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter." Mol Cell Biol 26(2): 689-698.
- Gary, R. and A. Bretscher (1995). "Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site." Mol Biol Cell 6(8): 1061-1075.
- Gatti, A., Z. Huang, P. T. Tuazon and J. A. Traugh (1999). "Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation." J Biol Chem 274(12): 8022-8028.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
- Hanks, S. K. and A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol 200: 38-62.
- Harvey, K. F., C. M. Pfleger and I. K. Hariharan (2003). "The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis." Cell 114(4): 457-467.
- Hipfner, D. R. and S. M. Cohen (2003). "The *Drosophila* sterile-20 kinase slik controls cell proliferation and apoptosis during imaginal disc development." PLoS Biol 1(2): E35.
- Hipfner, D. R., N. Keller and S. M. Cohen (2004). "Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth." Genes Dev 18(18): 2243-2248.
- Hornbeck, P. V., I. Chabra, J. M. Kornhauser, E. Skrzypek and B. Zhang (2004). "PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation." Proteomics 4(6): 1551-1561.
- Huang, S. and D. E. Ingber (1999). "The structural and mechanical complexity of cell-growth control." Nat Cell Biol 1(5): E131-138.
- Hughes, S. C. and R. G. Fehon (2006). "Phosphorylation and activity of the tumor suppressor Merlin and the ERM protein Moesin are coordinately regulated by the Slik kinase." J Cell Biol 175(2): 305-313.

- Hughes, S. C., E. Formstecher and R. G. Fehon (2010). "Sip1, the *Drosophila* orthologue of EBP50/NHERF1, functions with the sterile 20 family kinase Slik to regulate Moesin activity." J Cell Sci 123(Pt 7): 1099-1107.
- Johnston, L. A. (2009). "Competitive interactions between cells: death, growth, and geography." Science 324(5935): 1679-1682.
- Johnston, L. A. and P. Gallant (2002). "Control of growth and organ size in *Drosophila*." Bioessays 24(1): 54-64.
- Johnston, L. A., D. A. Prober, B. A. Edgar, R. N. Eisenman and P. Gallant (1999). "*Drosophila* myc regulates cellular growth during development." Cell 98(6): 779-790.
- King, C. C., E. M. Gardiner, F. T. Zenke, B. P. Bohl, A. C. Newton, B. A. Hemmings and G. M. Bokoch (2000). "p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)." J Biol Chem 275(52): 41201-41209.
- Kuramochi, S., T. Moriguchi, K. Kuida, J. Endo, K. Semba, E. Nishida and H. Karasuyama (1997). "LOK is a novel mouse STE20-like protein kinase that is expressed predominantly in lymphocytes." J Biol Chem 272(36): 22679-22684.
- Lamson, R. E., M. J. Winters and P. M. Pryciak (2002). "Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20." Mol Cell Biol 22(9): 2939-2951.
- Lee, T. and L. Luo (2001). "Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development." Trends Neurosci 24(5): 251-254.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell 117(1): 69-81.
- Li, Y., J. Hu, R. Vita, B. Sun, H. Tabata and A. Altman (2004). "SPAK kinase is a substrate and target of PKC $\theta$  in T-cell receptor-induced AP-1 activation pathway." EMBO J 23(5): 1112-1122.
- Lim, J., A. Lennard, P. W. Sheppard and S. Kellie (2003). "Identification of residues which regulate activity of the STE20-related kinase hMINK." Biochem Biophys Res Commun 300(3): 694-698.
- Luhovy, A. Y., A. Jaber, J. Papillon, J. Guillemette and A. V. Cybulsky (2012). "Regulation of the Ste20-like kinase, SLK: involvement of activation segment phosphorylation." J Biol Chem 287(8): 5446-5458.

- Machicoane, M., C. A. de Frutos, J. Fink, M. Rocancourt, Y. Lombardi, S. Garel, M. Piel and A. Echard (2014). "SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation." J Cell Biol 205(6): 791-799.
- Madhani, H. D., C. A. Styles and G. R. Fink (1997). "MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation." Cell 91(5): 673-684.
- Maier, D., S. Cheng, D. Faubert and D. R. Hipfner (2014). "A broadly conserved g-protein-coupled receptor kinase phosphorylation mechanism controls *Drosophila* smoothed activity." PLoS Genet 10(7): e1004399.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science 298(5600): 1912-1934.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita and S. Tsukita (1998). "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." J Cell Biol 140(3): 647-657.
- Morgan, T. H. (1910). "Sex Limited Inheritance in *Drosophila*." Science 32(812): 120-122.
- Muller, H. J. (1918). "Genetic Variability, Twin Hybrids and Constant Hybrids, in a Case of Balanced Lethal Factors." Genetics 3(5): 422-499.
- Neto-Silva, R. M., B. S. Wells and L. A. Johnston (2009). "Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing." Annu Rev Cell Dev Biol 25: 197-220.
- Nolen, B., S. Taylor and G. Ghosh (2004). "Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation." Mol Cell 15(5): 661-675.
- O'Reilly, P. G., S. Wagner, D. J. Franks, K. Cailliau, E. Browaeys, C. Dissous and L. A. Sabourin (2005). "The Ste20-like kinase SLK is required for cell cycle progression through G2." J Biol Chem 280(51): 42383-42390.
- Pan, D. (2010). "The hippo signaling pathway in development and cancer." Dev Cell 19(4): 491-505.
- Pike, A. C., P. Rellos, F. H. Niesen, A. Turnbull, A. W. Oliver, S. A. Parker, B. E. Turk, L. H. Pearl and S. Knapp (2008). "Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites." EMBO J 27(4): 704-714.

- Praskova, M., A. Khoklatchev, S. Ortiz-Vega and J. Avruch (2004). "Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras." Biochem J 381(Pt 2): 453-462.
- Prober, D. A. and B. A. Edgar (2000). "Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing." Cell 100(4): 435-446.
- Rauch, J., N. Volinsky, D. Romano and W. Kolch (2011). "The secret life of kinases: functions beyond catalysis." Cell Commun Signal 9(1): 23.
- Reczek, D. and A. Bretscher (1998). "The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule." J Biol Chem 273(29): 18452-18458.
- Roovers, K., S. Wagner, C. J. Storbeck, P. O'Reilly, V. Lo, J. J. Northey, J. Chmielecki, W. J. Muller, P. M. Siegel and L. A. Sabourin (2009). "The Ste20-like kinase SLK is required for ErbB2-driven breast cancer cell motility." Oncogene 28(31): 2839-2848.
- Sabourin, L. A. and M. A. Rudnicki (1999). "Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase." Oncogene 18(52): 7566-7575.
- Shapiro, P. S., A. M. Whalen, N. S. Tolwinski, J. Wilsbacher, S. J. Froelich-Ammon, M. Garcia, N. Osheroff and N. G. Ahn (1999). "Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase II $\alpha$  through a mechanism independent of phosphorylation." Mol Cell Biol 19(5): 3551-3560.
- Song, H., K. K. Mak, L. Topol, K. Yun, J. Hu, L. Garrett, Y. Chen, O. Park, J. Chang, R. M. Simpson, C. Y. Wang, B. Gao, J. Jiang and Y. Yang (2010). "Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression." Proc Natl Acad Sci U S A 107(4): 1431-1436.
- Speck, O., S. C. Hughes, N. K. Noren, R. M. Kulikaukas and R. G. Fehon (2003). "Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity." Nature 421(6918): 83-87.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982). "Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes." Science 218(4570): 341-347.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai and S. Tsukita (1994). "ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons." J Cell Biol 126(2): 391-401.
- Turunen, O., T. Wahlstrom and A. Vaheri (1994). "Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family." J Cell Biol 126(6): 1445-1453.



- Viswanatha, R., P. Y. Ohouo, M. B. Smolka and A. Bretscher (2012). "Local phosphocycling mediated by LOK/SLK restricts ezrin function to the apical aspect of epithelial cells." J Cell Biol 199(6): 969-984.
- Vitari, A. C., M. Deak, N. A. Morrice and D. R. Alessi (2005). "The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases." Biochem J 391(Pt 1): 17-24.
- Wagner, S., T. A. Flood, P. O'Reilly, K. Hume and L. A. Sabourin (2002). "Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading." J Biol Chem 277(40): 37685-37692.
- Winters, M. J. and P. M. Pryciak (2005). "Interaction with the SH3 domain protein Bem1 regulates signaling by the *Saccharomyces cerevisiae* p21-activated kinase Ste20." Mol Cell Biol 25(6): 2177-2190.
- Wu, C., M. Whiteway, D. Y. Thomas and E. Leberer (1995). "Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 270(27): 15984-15992.
- Yu, J., C. Riou, D. Davidson, R. Minhas, J. D. Robson, M. Julius, R. Arnold, F. Kiefer and A. Veillette (2001). "Synergistic regulation of immunoreceptor signaling by SLP-76-related adaptor Clnk and serine/threonine protein kinase HPK-1." Mol Cell Biol 21(18): 6102-6112.
- Zhang, Y. H., K. Hume, R. Cadonic, C. Thompson, A. Hakim, W. Staines and L. A. Sabourin (2002). "Expression of the Ste20-like kinase SLK during embryonic development and in the murine adult central nervous system." Brain Res Dev Brain Res 139(2): 205-215.
- Zhou, G. L., Y. Zhuo, C. C. King, B. H. Fryer, G. M. Bokoch and J. Field (2003). "Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration." Mol Cell Biol 23(22): 8058-8069.

